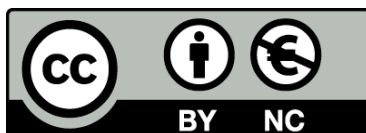




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Efecto del MK-801 y otros ligandos PCP y Sigma sobre la neurotransmisión noradrenérgica periférica

David Pubill Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Farmacologia i Química Terapèutica

Programa de Doctorat en Farmacologia. Bienni 1993-1995

**EFECTO DEL MK-801 Y OTROS LIGANDOS PCP Y
SIGMA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN
NORADRENÉRGICA PERIFÉRICA**

Tesis que presenta Don David Pubill Sánchez
para optar al título de Doctor en Farmacia,
bajo la dirección de los Drs. Jorge Camarasa
García y Elena Escubedo Rafa y siendo tutor el
Dr. Jorge Camarasa García.



ARMACIA

Barcelona, Diciembre de 1996.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700084609

2

De la presente tesis han derivado las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

-First European Congress of Pharmacology; Milán, 16-19 junio, 1995:

D. PUBILL, M. Pallàs, E. Escubedo y J. Camarasa.

"MK-801 potentiates the effect of noradrenaline in isolated rat vas deferens"

- D. PUBILL, A. M. Canudas, D. Gasulla, M. Pallàs, E. Escubedo y J. Camarasa.

"MK-801 enhances noradrenergic neurotransmission in rat vas deferens"

European Journal of Pharmacology, 303, 171-175, 1996.

- XX Congreso de la Sociedad Española de Farmacología; IV Reunión Hispano-Française de Pharmacologie. Granada, 18-20 septiembre, 1996:

D. PUBILL, D. Gasulla, A. Camins, M. Pallàs, E. Escubedo y J. Camarasa.

"Binding of [³H]nisoxetine to rat vas deferens membranes: modulation by sigma and PCP ligands"

A. M. Canudas, D. PUBILL, M. Pallàs, A. Camins, J. Camarasa y E. Escubedo.

"Effect of sigma and PCP ligands on noradrenaline-induced contractile responses in isolated rat vas deferens".

- D. PUBILL, D. Gasulla, F.X. Sureda, A. Camins, M. Pallàs, E. Escubedo y J. Camarasa.

"Characterization of [³H]nisoxetine binding in rat vas deferens membranes: modulation by sigma and PCP ligands".

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. En evaluación.

AGRAÏMENTS

Sense la col·laboració dels qui segueixen, aquest treball no hauria pogut portar-se a terme. Vull, en aquestes línies, agrair a totes les persones que, bé en el camp professional o bé en el camp personal han contribuït a fer-lo realitat:

Al Dr. Tomàs Adzet, cap de la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia de la Facultat de Farmàcia de Barcelona, per acceptar-me, ara ja fa uns quants anys, a la Unitat, per la confiança que en mi diposita i per posar a la meva disposició tots els medis necessaris per a la realització d'aquest treball.

Al Dr. Jordi Camarasa i a la Dra. Elena Escubedo, per haver dirigit aquest treball aportant tots els seus coneixements i experiència, pel recolzament que d'ells sempre he rebut i per comptar amb mi en tot moment, inclús en temps no gaire favorables per iniciar noves línies de recerca.

Al Dr. Josep Iglesias, per facilitar la meva tasca a la Unitat i per l'interès que sempre ha mostrat pel meu treball.

A l'Anna M^a Canudas, pel gran entusiasme i perseverància que sempre ha mostrat en el seu treball, per canul·lar i "anudar" com la millor, i per la seva amicitat i simpatia. A en Dani Gasulla, per la seva constància, per treballar sempre a plè rendiment inclús en moments personals difícils, pel seu bon humor i, com no, per la harmonia que hi ha hagut sempre entre nosaltres. Sense ells, aquest treball no seria ara a les vostres mans.

A en Francesc Sureda, pels anys que fa que ens coneixem, per ser un bon amic i pels bons moments que hem passat al laboratori. A la Mercè Pallàs, pel seu ajut i assessorament; i a en Toni Camins, qui va començar a formar-me com investigador, pel seu sempre adequat consell. També a l'Andrés Jiménez, per volcar tots els seus esforços professionals en evitar que esdevinguem mutants, i a la Teresa Iglesias, bona companya i sempre amb ganes d'ajudar.

Als companys de la línia d'investigació: Cecília, Laura, Belén, Julio, Leticia, Noemí i Eva, per les bones estones que passem treballant junts, perquè compartir cada dia material i espai fan que la Unitat sigui com una segona casa per a tots.

Al Dr. Joan Carles Laguna i tot el seu equip: Rosa Sánchez, Marta Alegret, Manel Vázquez, Manel Merlos, Cristina, Maria, Sònia, Àgatha, Ana i en J.C. Verd; així com a la resta de companys i professors de la Unitat, pel companyerisme que sempre ha regnat entre nosaltres, per compartir "ecosistema" i per contribuir també a crear el clima de que abans parlava.

Al personal de l'estabulari de la Facultat, i molt en especial a la Sra. Isabel Guirao, per procurar que sempre tinguéssim rates disponibles en les millors condicions. Tanmateix, vull agrair al Dr. Jesús Llenas, de Laboratoris Almirall, el seu assessorament en la preparació d'un dels models experimentals d'aquest treball.

Als meus amics de sempre Xavi, David, Juan Manuel i Javier, per aguantar-me durant tants anys i soportar les meves parrafades científiques; a la Maica, per estar sempre disposada a parlar i escoltar; i als companys i amics de carrera, Ricard, Albert, Marta, Neus i Anna.

A la meva família, pel seu interès vers la meva feina i el recolzament que d'ells sempre he rebut.

A la Nuri, perquè conèixer-la ha estat el millor que m'ha passat en aquests anys, per la bona química que ens uneix i perquè ha estat el vertader estímul que em faltava per mirar cap endavant.

*Als meus pares, perquè
m'ho han donat tot i han fet
possible que seguís aquesta
trajectòria.*

ÍNDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	1
<u>I.- PARTE TEÓRICA</u>	7
1.- LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	9
1.1.- Generalidades.....	9
1.2.- Receptores metabotrópicos.....	10
1.3.- Receptores ionotrópicos.....	10
1.3.a.- Receptores AMPA/kainato.....	11
1.3.b.- El receptor NMDA.....	11
1.4.- Patologías asociadas a aminoácidos excitadores.....	17
2.- EL RECEPTOR PCP	19
2.1.- Introducción.....	19
2.2.- Subtipos de receptores PCP.....	21
2.3.- Papel fisiológico de los receptores PCP.....	21
2.4.- El dextrorfano como ligando PCP.....	23
3.- LOS RECEPTORES SIGMA	24
3.1.- Perspectiva histórica.....	24
3.2.- Propiedades de los receptores sigma.....	25
3.3.- Receptores sigma y psiquiatría.....	26
3.4.- Subtipos de receptores sigma y distribución en el SNC.....	28
3.5.- Papel fisiológico de los receptores sigma.....	31
3.5.a.- Interacción con las respuestas mediadas por el NMDA.....	31
3.5.b.- Interacción con el sistema dopaminérgico.....	32
3.6.- Papel de los receptores sigma en el conducto deferente de ratón.....	33

4.- TRANSPORTE DE LA NORADRENALINA.....	35
4.1.- Generalidades.....	35
4.2.- Factores que lo modulan en el conducto deferente.....	36
4.2.a.- Dependencia del sodio.....	36
4.2.b.- Modulación por colina.....	37
4.2.c.- Dependencia del cloruro.....	37
4.2.d.- Efecto del litio.....	38
4.2.e.- Efecto de la edad.....	38
4.2.f.- Tratamiento con inhibidores de la captación neuronal.....	39
4.3.- Marcaje de los sistemas de transporte de noradrenalina.....	39
4.4.- Efecto de los ligandos sigma y PCP sobre el transporte de catecolaminas.....	40
<u>II.- PARTE EXPERIMENTAL.....</u>	45
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	47
1.- OBTENCIÓN DE LOS CONDUCTOS DEFERENTES.....	49
2.- ENSAYOS EN ÓRGANO AISLADO.....	51
2.1.- Fundamento.....	51
2.2.- Montaje de los conductos deferentes en el baño de órganos.....	53
2.3.- Respuestas inducidas por estimulación eléctrica.....	54
2.3.a.- Introducción.....	54
2.3.b.- Protocolo experimental.....	55
2.4.- Estimulación con noradrenalina exógena.....	56
2.4.a.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina.....	57
2.4.b.- Curvas concentración-respuesta en presencia de yohimbina.....	57
2.5.- Experimentos encaminados a determinar la participación o no participación del receptor NMDA.....	58

2.5.b.- Curvas en presencia de D-AP5.....	58
2.6.- Curvas concentración-respuesta a NA en órganos procedentes de ratas reserpinizadas.....	59
2.6.a.- Finalidad.....	59
2.6.b.- Administración de la reserpina.....	59
2.6.c.- Protocolo experimental.....	60
2.7.- Experimentos con baja concentración de sodio en el medio.....	60
2.8.- Efecto sobre la tensión basal.....	61
2.8.a.- Rata normal.....	61
2.8.b.- Inhibición de la actividad espontánea por prazosina y otros agentes farmacológicos.....	62
2.8.c.- Ratas reserpinizadas.....	62
2.9.- Análisis de los datos.....	63
2.9.a.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina.....	63
2.9.b.- Obtención de la CE_{100}	63
2.9.c.- Cálculo de la K_L	64
3.- ENSAYOS DE UNIÓN CON [³H]NISOXETINA.....	65
3.1.- Preparación de las membranas.....	65
3.2.- Determinación proteica. Método de Bradford.....	66
3.2.a.- Preparación del colorante.....	66
3.2.b.- Descripción del ensayo.....	66
3.3.- Tampones y soluciones.....	67
3.3.a.- Tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.....	67
3.3.b.- Tampón Tris-HCl 50 mM (sacarosa 250 mM), pH 7,4.....	68
3.3.c.- Solución de polietilimina al 0,5 % (v/v).....	68
3.4.- Condiciones para determinar la unión de un ligando a un receptor.....	68
3.4.a.- Generalidades.....	68
3.4.b.- Condiciones del ensayo.....	70
3.4.c.- Separación del radioligando unido del libre.....	71
3.4.d.- Técnica del centelleo líquido.....	73

3.5.- Descripción de los ensayos de unión.....	75
3.5.a.- Incubación.....	75
3.5.b.- Separación del radioligando unido del libre.....	76
3.5.c.- Tratamiento de los resultados.....	77
3.5.d.- Ensayos realizados.....	77
4.- ENSAYOS DE CAPTACIÓN DE [³H]NORADRENALINA.....	86
4.1.- Tampones utilizados.....	86
4.2.- Descripción de los experimentos.....	86
4.3.- Tratamiento de los resultados.....	88
5.- EXPERIMENTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	89
5.1.- Fundamento.....	89
5.2.- Animales empleados y procedimiento quirúrgico.....	90
5.2.a.- Rata normal.....	90
5.2.b.- Rata reserpinizada.....	93
5.2.c.- Rata desmedulada.....	94
5.3.- Protocolo experimental.....	95
5.3.a.- Administración del MK-801.....	95
5.3.b.- Propranolol.....	96
5.3.c.- Prazosina.....	96
5.3.d.- Potenciación del efecto presor de la noradrenalina.....	96
5.4.- Análisis de los datos.....	97
6.- FÁRMACOS, REACTIVOS Y MATERIAL EMPLEADOS.....	98
6.1.- Fármacos y reactivos.....	98
6.2.- Material fungible.....	100
6.3.- Aparatos.....	100

RESULTADOS	101
1.- EXPERIMENTOS EN ÓRGANO AISLADO	103
1.1.- Experimentos con MK-801.....	103
1.1.a.- Efecto del MK-801 sobre las respuestas inducidas por estimulación eléctrica.....	103
1.1.b.- Efecto del MK-801 sobre las respuestas inducidas por noradrenalina.....	104
1.1.c.- Experimentos encaminados a dilucidar el mecanismo de acción.....	107
1.1.d.- Efecto del MK-801 sobre la tensión basal.....	111
1.2.- Experimentos con otros ligandos sigma y PCP.....	113
1.2.a.- Efecto sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica.....	113
1.2.b.- Efecto sobre las contracciones inducidas por NA exógena.....	115
2.- ENSAYOS DE UNIÓN CON [³H]NISOXETINA	127
2.1.- Influencia del sodio.....	127
2.2.- Ensayos de saturación.....	128
2.3.- Ensayos cinéticos.....	131
2.4.- Ensayos de competición.....	135
3.- CAPTACIÓN DE [³H]NORADRENALINA	139
3.1.- Cinética de captación de [³ H]noradrenalina en conducto deferente de rata.....	139
3.2.- Inhibición de la captación de la [³ H]noradrenalina por ligandos sigma y PCP.....	140
4.- EXPERIMENTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL CON MK-801	145
4.1.- Rata normal.....	145
4.1.a.- Rata no pretratada.....	145
4.1.b.- Efecto en ratas vagotomizadas.....	147

4.2.-Rata reserpinizada.....	149
4.3.- Rata desmedulada.....	150
4.3.a.- Efecto del MK-801.....	150
4.3.b.- Potenciación del efecto presor de la noradrenalina.....	151
<u>III.- DISCUSIÓN</u>	153
<u>IV.- CONCLUSIONES</u>	169
<u>V.- BIBLIOGRAFÍA</u>	175

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Uno de los objetivos más importantes para la farmacología actual es el conocimiento de los mecanismos que median las enfermedades del sistema nervioso central (SNC), tanto aquellas de origen degenerativo como las provocadas por desórdenes funcionales. Dicho conocimiento llevaría al desarrollo de fármacos suficientemente selectivos para combatir estas enfermedades sin causar efectos indeseables.

De la gran cantidad de estudios realizados al respecto hasta la actualidad, parece ser que la neurotransmisión por aminoácidos excitatorios (AAE), como el glutamato, tiene un papel crucial en la aparición de enfermedades de tipo neurodegenerativo. Concretamente, se considera que una sobreactivación del subtipo de receptores glutamatérgicos NMDA (receptor a N-metil-D-aspartato) sería la responsable de muchas de estas patologías ya que dicha sobreactivación provocaría una entrada masiva de calcio por el canal iónico asociado y provocaría la muerte neuronal.

Partiendo de esta hipótesis, se desarrollaron moléculas antagonistas del receptor NMDA, tanto de tipo competitivo como no competitivo (bloqueantes del canal iónico asociado), las cuales deberían presentar un efecto neuroprotector. Entre los antagonistas no competitivos de este receptor se encuentran sustancias como la fenciclidina o PCP (conocida como "polvo de ángel" en el mundo de las drogas de abuso), de ahí que también se les denomine ligandos PCP, y el MK-801 o dizocilpino.

Estas moléculas, sin embargo, resultaron presentar una serie de efectos indeseables (psicotomiméticos, convulsivantes, alucinógenos...) que impedían su uso en clínica, aunque todavía son útiles en investigación para estudiar más en profundidad estos receptores. Por otra parte, la complejidad del sistema nervioso central y la gran cantidad de vías interconectadas dificulta el estudio de sus efectos.

Por ello sería interesante estudiar los efectos de estas moléculas en tejidos periféricos, donde las vías nerviosas implicadas son más simples. Experimentos con MK-801, realizados por nuestro equipo de investigación en conducto deferente de rata aislado, apuntaban a la existencia de un efecto no relacionado con el bloqueo del receptor NMDA. Concretamente, el MK-801 inducía una potenciación de las contracciones inducidas por noradrenalina en ese tejido. Estaba descrito que, en sistema nervioso central, el PCP y el MK-801 eran capaces de inhibir la captación de catecolaminas en los terminales nerviosos, mientras que a nivel periférico sólo se habían efectuado experimentos *in vitro* en células cromafines y en arteria caudal de rata.

Por otra parte, estaba descrito que la capacidad de inhibir de la captación de catecolaminas era presentada también la presentaban los denominados ligandos sigma (σ), los receptores de los cuales habían estado inicialmente clasificados de forma errónea como pertenecientes a la familia de los receptores opioides y posteriormente confundidos con los lugares de unión de la fenciclidina. Parece ser que fármacos pertenecientes a esta familia podrían ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades como la esquizofrenia, y se ha demostrado que sus receptores modulan tanto la actividad NMDA como la dopaminérgica. Entre estos fármacos encontramos, entre otros, al haloperidol (utilizado como neuroléptico) y al dextrometorfano (ampliamente utilizado como antitusivo).

Por lo tanto, consideramos interesante realizar un estudio comparativo de los efectos de moléculas pertenecientes a los dos grupos (ligandos σ y ligandos PCP) sobre la neurotransmisión noradrenérgica periférica en un órgano donde ésta predomina, como

es la porción epididimal del conducto deferente de rata e intentar, posteriormente, determinar si este efecto tiene alguna repercusión en animal entero.

Así pues, los **OBJETIVOS** de la presente tesis son:

- Estudiar, en la porción epididimal aislada del conducto deferente de la rata, los efectos del MK-801 sobre la neurotransmisión noradrenérgica y determinar el mecanismo de acción.

- Comparar estos efectos con los de otros antagonistas no competitivos del receptor NMDA, bloqueadores del canal asociado, y con los de algunos ligandos σ . Del primer grupo se estudiará el PCP, la tenociclidina (TCP) y el dextrofan. Del segundo, el haloperidol, el dextrometorfano y el (+)-3-PPP (3-[3-hidroxifenil]-N-(1-propil)-piperidina).

- Determinar el efecto de estos compuestos sobre la captación de noradrenalina en la porción epididimal del conducto deferente de la rata, estudiando la capacidad de los mismos para inhibir la incorporación de noradrenalina tritiada ($[^3\text{H}]$ noradrenalina) en secciones de este tejido.

- Caracterizar, a nivel molecular, la interacción de estos compuestos con el transportador de la noradrenalina en una preparación de membranas de conducto deferente de rata, utilizando un marcador selectivo de este transportador como es la $[^3\text{H}]$ nisoxetina.

- Debido a que el perfil de unión de la $[^3\text{H}]$ nisoxetina todavía no estaba descrito en el conducto deferente de la rata, caracterizar previamente dicha unión mediante ensayos de saturación y cinéticos.

- Finalmente, determinar si los efectos potenciadores sobre la noradrenalina del MK-801 *in vitro* tienen repercusión en animal entero a nivel cardiovascular, sobre un parámetro de elevado componente adrenérgico como es la presión arterial.

I.- PARTE TEÓRICA

1.- LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.

1.1.- Generalidades

Hoy en día es bien sabido que el glutamato es el principal aminoácido excitador en el sistema nervioso central (Watkins y Evans, 1981). De hecho, se cree que el 70 % de las sinapsis excitadoras del sistema nervioso central utilizan glutamato como neurotransmisor. Por otra parte, a nivel periférico, los receptores a aminoácidos excitadores están ampliamente distribuidos, lo cual no quiere decir, sin embargo, que se encuentren en todos los órganos (Erdő, 1991). Hasta el momento se han descrito cuatro subtipos de receptores glutamatérgicos (Watson y Girdlestone, 1995), de tipo metabotrópico (acoplados a proteína G) y de tipo ionotrópico (acoplados a canales iónicos específicos para un determinado catión). Dentro de estos últimos se encuentran los subtipos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), kainato y NMDA, del cual hablaremos en más profundidad más adelante.

1.2.- Receptores metabotrópicos

Estructuralmente son similares a otros receptores acoplados a proteínas G, aunque presentan diferencias respecto a los ya conocidos. Su agonista más potente y selectivo es el 1S,3R-aminociclopentil-1,3-dicarboxilato (1S, 3R-ACPD) (East y Garthwaite, 1992; Manzoni y col., 1993). El único antagonista selectivo descrito de estos receptores es el ácido L(+)-2-amino-3-fosfonopropiónico (L(+)-AP3), aunque este compuesto parece ser que no inhibe la respuesta al agonista sobre algunos subtipos de estos receptores.

Son una familia de receptores altamente heterogénea, acoplada a múltiples segundos mensajeros como la hidrólisis de fosfatidilinositoles (Guimarand y col., 1991a,1991b; Schoepp y col., 1991; Suzdak y col., 1993) o a la disminución en la producción de AMP cíclico (Schoepp y Conn, 1993). Ello hace que, para los receptores metabotrópicos, la denominación de “receptores a aminoácidos excitadores” sea imprecisa, ya que su activación puede tener efectos excitadores o inhibidores dependiendo de los mensajeros secundarios que resulten de su activación..

1.3.- Receptores ionotrópicos.

Son receptores acoplados a canales iónicos específicos para determinados cationes. Los receptores AMPA, kainato y NMDA son similares en estructura a otros grupos de receptores asociados a canales iónicos, como los nicotínicos o los GABAérgicos. La activación de estos receptores a aminoácidos excitadores conduce a la despolarización de la neurona, debido al flujo de cargas positivas desde el espacio sináptico al citoplasma (Heinomen y col., 1989; Kiedrowski y col., 1994). Se trata de receptores formados por la combinación de diferentes subunidades, las cuales conferirán las características particulares de cada subtipo de receptor (Sprenkel y Seeburg, 1993).

1.3.a.- Receptores AMPA/kainato.

La activación de los receptores AMPA/kainato provoca la apertura de un canal catiónico que permite el paso de sodio y potasio hacia el interior de la célula (Di Porzio y col., 1993), mientras que la permeabilidad al calcio es baja. Estos subtipos de receptores se diferencian farmacológicamente del subtipo NMDA por su diferente perfil de selectividad frente a diversos agonistas y antagonistas. No obstante, la diferenciación entre los subtipos AMPA y kainato es más difícil de establecer.

Respecto a los efectos que la activación de este subtipo de receptores provoca en el SNC, se ha establecido que son los responsables del componente rápido característico de la acción del glutamato en la neurona postsináptica, provocando su despolarización (Zorumski y Thio, 1992). Parece ser que este subtipo de receptores actúa conjuntamente con los NMDA en la inducción y mantenimiento de la potenciación a largo término (long-term potentiation, LTP) (ver apartado siguiente).

1.3.b.- El receptor NMDA.

El receptor NMDA, nombrado así por ser activado selectivamente por el N-metil-D-aspartato, es uno de estos receptores ionotrópicos cuya activación se traduce en la apertura de un canal iónico de elevada permeabilidad por el Ca^{2+} que conducirá a la despolarización de la neurona. En situación de reposo, el receptor NMDA está inhibido por el magnesio, que bloquea el canal iónico asociado a concentraciones fisiológicas (Varga y col., 1992). Sólo cuando la célula ha sido previamente despolarizada, el Mg^{2+} abandona el canal y permite el paso de iones a través del mismo. Es por ello que para la activación del receptor NMDA se requiere una previa despolarización de la membrana postsináptica que vendrá mediada por la activación de, por ejemplo, el subtipo de receptores glutamatérgicos AMPA/kainato (fig. 1). Será entonces cuando el receptor NMDA se activará y tendrá lugar una importante entrada de Ca^{2+} al interior de la neurona, que conllevará a una despolarización mucho más importante de la misma.

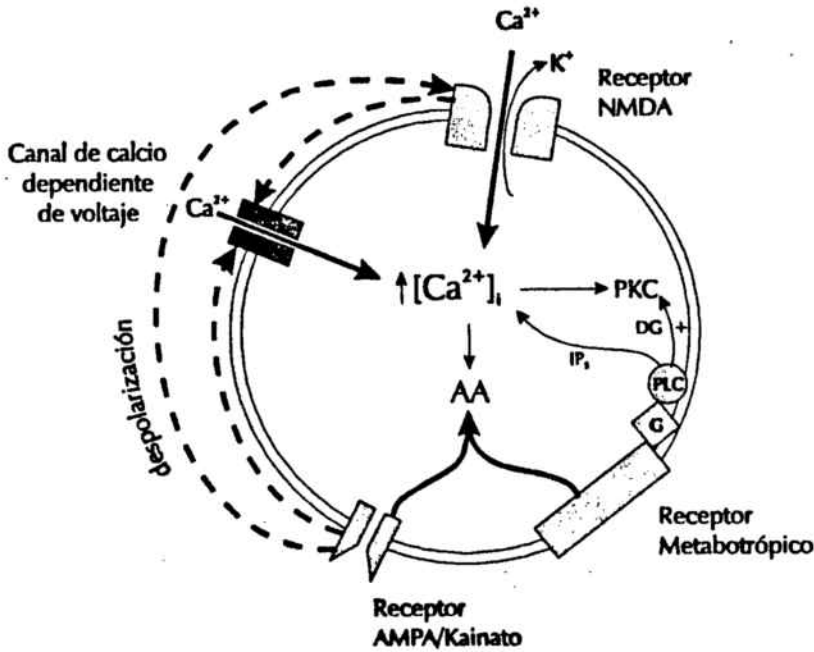


Figura 1.- Esquema de la respuesta celular inducida por la combinación de la activación de los receptores glutamatergicos. La acción sobre el receptor AMPA/kainato despolariza la neurona y facilita la operatividad del receptor NMDA y de los canales de calcio voltaje-dependientes que permiten el paso de Ca^{2+} al citoplasma. El receptor metabotrópico es capaz de movilizar el calcio de los reservorios internos. Como consecuencia de esta entrada de Ca^{2+} tiene lugar, entre otros acontecimientos, la formación de ácido araquidónico.

Esta mayor despolarización secundaria a la previa activación AMPA/kainato ha permitido elaborar la hipótesis de que el receptor NMDA actuaría como un sistema de amplificación que sería el responsable de la inducción y el mantenimiento de procesos como la potenciación o la depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente).

Sin embargo, el receptor NMDA es mucho más complejo. La interacción entre el agonista y el receptor no es suficiente. Ello es debido al requerimiento absoluto de la presencia del aminoácido glicina que, al interaccionar con un lugar de unión específico, potencia las acciones del glutamato de manera parecida a como las benzodiazepinas potencian las del GABA sobre el receptor $GABA_A$.

A raíz de recientes estudios farmacológicos y cinéticos se ha estipulado que el receptor NMDA posee, como mínimo, 2 lugares de unión para el glutamato y NMDA y

2 para la glicina. La apertura del canal no tendría lugar hasta que los cuatro lugares estuvieran ocupados (fig. 2).

Electrofisiológicamente, el receptor NMDA se caracteriza por una reacción tardía al glutamato y por un tiempo de apertura del canal largo, de hasta décimas de segundo. Ello se debe a que la afinidad que posee el glutamato por el receptor NMDA es mayor que la que muestra por el subtipo AMPA, con lo cual el canal asociado al receptor NMDA puede abrirse varias veces.

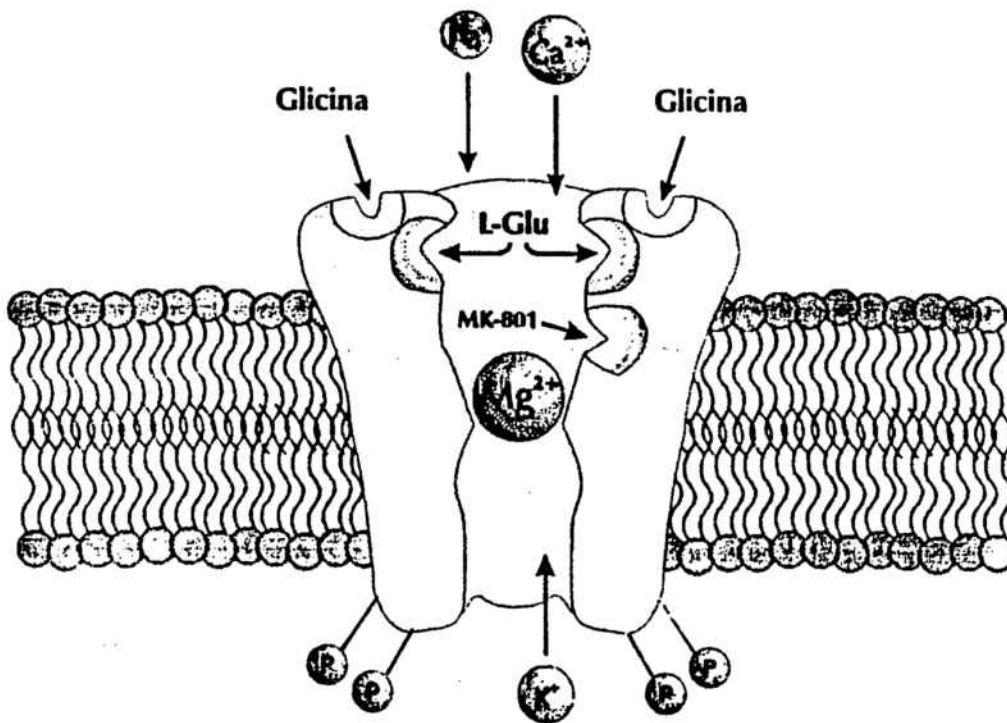


Figura 2.—Representación esquemática del receptor NMDA y de algunos de sus lugares de modulación. En condiciones de reposo, el ion Mg^{2+} bloquea el canal, impidiendo el paso de Na^+ y Ca^{2+} al citoplasma y la salida de K^+ . Los antagonistas no competitivos del receptor (bloqueantes del canal) como el MK-801 o el PCP se unen a un lugar próximo al del Mg^{2+} . En el interior de la célula existen dominios susceptibles de ser fosforilados, modulando la activación del receptor.

El conocimiento de la funcionalidad de un receptor depende en gran parte de las herramientas farmacológicas de las que se disponga. Por esta razón, durante los últimos años, se han desarrollado un gran número de compuestos capaces de unirse al receptor NMDA (Kudo y col., 1991; Mannaioni y col., 1994). Otro de los motivos que ha impulsado la investigación sobre estas moléculas ha sido la posibilidad de utilizarlas en el

tratamiento de diferentes desórdenes del SNC, para los que todavía no se dispone de un tratamiento adecuado y en los que los receptores NMDA parecen tener una gran relevancia. Además, estos compuestos podrían contribuir a lograr una mejor comprensión de algunos procesos fisiológicos poco conocidos hasta el momento, como son la LTP, la LTD o la excitotoxicidad (citotoxicidad producida por una sobreactivación del receptor) (Kawai y col., 1992).

Los antagonistas competitivos del receptor NMDA son moléculas muy sencillas, casi todas derivadas de los ácidos D-amino-5-fosfonopentanóico (D-AP5) o D-amino-7-fosfonopentanóico (D-AP7) (Vázquez y col., 1992). En la siguiente figura (fig. 3) se representan las estructuras de los agonistas y algunos antagonistas competitivos del receptor NMDA:

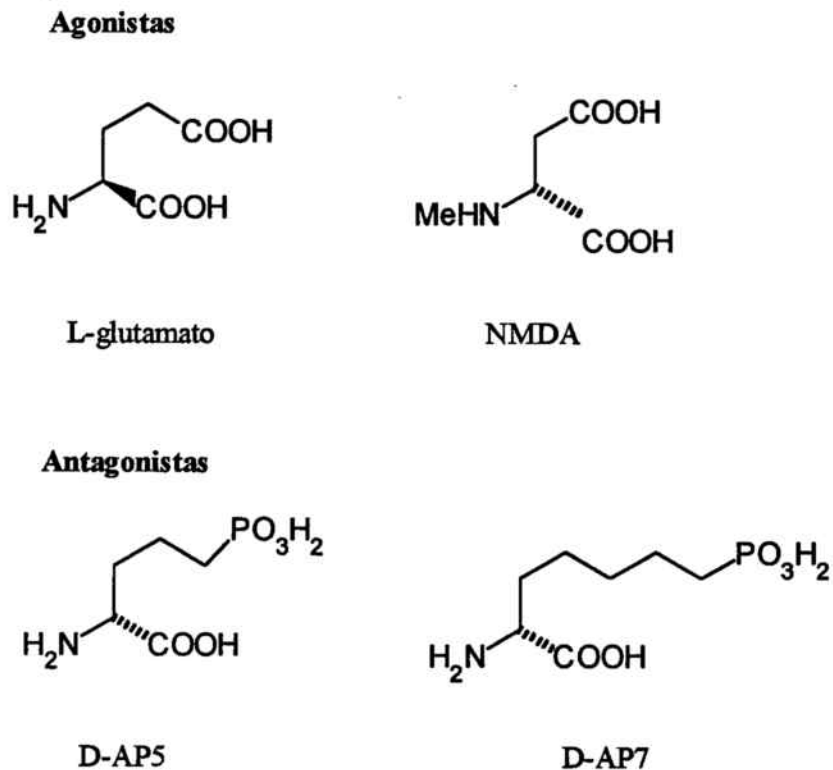


Figura 3.- Agonistas y antagonistas competitivos del receptor NMDA.

Modulación alostérica del receptor NMDA.

Modulación por glicina y poliaminas.

La modulación alostérica por glicina que sufre el receptor NMDA es una de sus características más notables (Bonhaus y col., 1987). Varios autores describen que la actividad del canal iónico asociado se ve incrementada por el aminoácido glicina (Johnson y Ascher, 1987; Reynolds y col., 1987; Oliver y col., 1990). Esta modulación resultó ser insensible a estripcina, la cual inhibe los efectos de la glicina sobre su receptor medular, descrito años antes. Por lo tanto, se ponía de manifiesto un nuevo lugar de unión, el cual se denominó "lugar de unión de la glicina insensible a estripcina". Poco después se comprobó que el receptor NMDA posee un requerimiento absoluto de glicina para su activación completa (Kleckner y Dingledine, 1988; McBain y col., 1989).

Parece ser que el mecanismo por el cual la glicina modula el receptor NMDA es múltiple. Por un lado, impide la disminución en la activación del receptor que aparece cuando el agonista se aplica durante un período largo de tiempo (desensibilización). Por otro lado, posibilita la apertura del canal (Lerma y col., 1990). Estos efectos se producen por un mecanismo de interacción alostérica, aunque no se descarta la existencia de una perturbación estérica entre los dos aminoácidos (Grimwood y col., 1993).

Los estudios realizados por Benaviste y col., (1990) intentaban determinar cuáles eran los patrones cinéticos por los cuales se regían el receptor NMDA y su desensibilización. El mejor ajuste se logró con un modelo que suponía la existencia de cuatro lugares de unión: dos para la glicina y dos para el glutamato o el NMDA. Todas las subunidades clonadas del receptor NMDA descritas hasta el momento contienen lugares de unión para el NMDA y para la glicina. Así, actualmente se considera que el aminoácido glicina se comporta más como un co-agonista que como un modulador del receptor NMDA.

Por otra parte, poliaminas como la espermina y la espermidina estimulan la frecuencia y la probabilidad de apertura del canal a concentraciones micromolares bajas, pero bloquean el canal a concentraciones milimolares (Williams y col., 1991; Rock y McDonald, 1992).

Modulación por bloqueantes del ionóforo.

Además de la coactivación del receptor NMDA por la glicina y el bloqueo por Mg^{2+} , existen otros mecanismos por los cuales este receptor es modulado. En el canal iónico asociado a este receptor existe un lugar de unión que es bloqueado por compuestos como el dizocilpino (MK-801) o los anestésicos disociativos como la fenciclidina o la ketamina, de manera análoga a como lo hace el Mg^{2+} , dando lugar a un antagonismo no competitivo del receptor NMDA (Lodge y Johnson, 1990) (fig. 2). Por este motivo, a estos compuestos se les ha denominado antagonistas no competitivos del receptor NMDA o bloqueadores del canal (McDonald y Nowak, 1990).

El ión zinc (Zn^{2+}) también es capaz de bloquear el canal (Eimerl y Schramm, 1992; 1993), pero a diferencia del Mg^{2+} su interacción no depende del grado de despolarización de la neurona. Además, parece ser que existen dos lugares de interacción con el receptor para este ión: uno de alta afinidad fuera del canal y otro de menor afinidad en el propio ionóforo, provocando este último un bloqueo similar al del Mg^{2+} (Reynolds, 1992).

Papel fisiológico del receptor NMDA.

El receptor NMDA está implicado en una gran cantidad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Una de las funciones más importantes que realiza es la regulación de la entrada de calcio extracelular necesaria para el mantenimiento de la potenciación y la depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente) (Shindou y col., 1993). Este tipo de procesos son cambios en la transmisión sináptica que comportan modificaciones en la morfología neuronal y que se conocen como plasticidad sináptica. La LTP se induce después de una repetida estimulación de las vías aferentes neuronales y

comporta un incremento en la eficacia de la transmisión sináptica (Malenka, 1992). Actualmente se considera a este fenómeno como el modelo sináptico del aprendizaje y la memoria en mamíferos.

Por otra parte, debe de existir un mecanismo por el cual esta potenciación de la neurotransmisión desaparezca, ya que si la LTP fuera el único fenómeno de plasticidad sináptica se llegaría inevitablemente a su saturación. Dicho mecanismo es la LTD, y representa el modelo sináptico del olvido (Tsumoto, 1993).

Aparte de la localización mayoritariamente sináptica, existen receptores NMDA fuera de la sinapsis. Su función sería la de mantener un tono adecuado de excitabilidad postsináptica. Algunos trabajos concluyen la existencia de receptores NMDA en las terminales noradrenérgicas, influyendo en la liberación de noradrenalina (Speciale y col., 1992) o bien que las neuronas noradrenérgicas se encuentran bajo control glutamatérgico (Pittaluga y Raitieri, 1991). A nivel periférico, por ejemplo, también se ha descrito que las neuronas noradrenérgicas que inervan el conducto deferente de rata se encuentran bajo control glutamatérgico, participando en el control motor de dicho órgano (Lara y Bastos-Ramos, 1988).

1.4.- Patologías asociadas a aminoácidos excitadores.

Se ha relacionado la patogénesis de algunas enfermedades del SNC con una activación excesiva de los receptores glutamatérgicos, o a algún defecto en su control. Así, un descontrol en su activación provocaría una entrada masiva de calcio en la neurona que desencadenaría toda una serie de procesos (proteólisis, degradación de ADN, formación de radicales libres y prostaglandinas, etc.) que llevarían a la neurodegeneración y muerte neuronal. Los antagonistas de estos receptores tendrían, pues, un efecto neuroprotector.

Entre las patologías asociadas se incluyen diferentes tipos de ataques epilépticos, isquemia, trauma en el SNC, dolor neuropático y algunas enfermedades

neurodegenerativas como las enfermedades de Huntington, Parkinson o Alzheimer. Por ejemplo, existe evidencia de que en la enfermedad de Parkinson tiene lugar, además de la conocida hipofunción dopaminérgica, una sobreactivación del sistema glutamatérgico (Tosk y col., 1994). Por ello, en los últimos años, se ha generado un gran interés en el desarrollo de antagonistas de los receptores glutamatérgicos con posible utilidad en el tratamiento de estas patologías. Sin embargo, los antagonistas no competitivos del receptor NMDA, como el MK-801, presentan una serie de efectos indeseables que imposibilitan su uso en clínica. Aunque para algunas de estas patologías ya existen tratamientos válidos, la investigación de nuevos agentes terapéuticos está justificada por la necesidad de conseguir fármacos con una menor incidencia de efectos secundarios o perfiles farmacocinéticos más favorables.

Entre los nuevos fármacos podemos destacar el felbamato, que es un bloqueador del canal asociado al receptor NMDA y antagonista del lugar de la glicina, de aplicación en el tratamiento de la epilepsia. También se están concentrando esfuerzos en antagonistas competitivos y en antagonistas o agonistas parciales del lugar de la glicina, muchos de ellos ya en fase clínica, como el ACPC (1-aminociclopropanocarboxilato). Otra diana farmacológica puede ser la inhibición de la liberación de glutamato con, por ejemplo, la lamotrigina, que se usa en el tratamiento de la epilepsia. Finalmente, para evitar los efectos indeseables que produce el bloqueo del receptor NMDA, también se investiga con antagonistas del receptor AMPA (para revisión, ver Danysz y col., 1995).

2.- EL RECEPTOR PCP.

2.1.- Introducción.

La fenciclidina (PCP), originalmente introducida en 1958 como anestésico disociativo, ha terminado siendo utilizada como droga de abuso con el nombre de "polvo de ángel". Este compuesto, administrado a voluntarios sanos, induce síntomas psicodislépticos, similares a los que presentan los pacientes esquizofrénicos, en los cuales provoca un agravamiento de sus síntomas que dura varias semanas. Se ha demostrado que existe un lugar de alta afinidad para el PCP en el canal iónico asociado al receptor NMDA.

Por otra parte, Anis y col. (1983) demostraron que los anestésicos disociativos como la fenciclidina y la ketamina podían inhibir las respuestas neuronales inducidas por el NMDA. Estos datos, junto al hecho de que la unión de la [³H]tenociclidina ([³H]TCP, 1-(2-tienil)-ciclohexilpiperidina, un análogo del PCP que se utiliza para marcar los lugares de unión del PCP al complejo receptor NMDA) a membranas de cerebro de rata fuera estimulado por la presencia de 10 μM de glutamato (Loo y col., 1987), daban evidencia de un complejo receptor NMDA-PCP en este tejido.

Otros estudios mostraban que el MK-801 presentaba, al igual que el PCP, una inhibición de los procesos neuronales mediados por el NMDA (Wong y col., 1986).

Ensayos de *binding* demostraron que el MK-801 inhibía la unión del [³H]TCP con elevada afinidad, ajustándose a un modelo de dos lugares de unión con una curva de inhibición que presentaba un coeficiente de Hill de $0,45 \pm 0,02$ (Loo y col., 1987). El análisis informático de los datos proporcionó los valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 100 ± 19 nM y de 4600 ± 9500 nM respectivamente para cada lugar de unión. La adición de $0,5 \mu\text{M}$ de glutamato provocó un incremento de la afinidad del MK-801 por sus lugares de unión, observándose una reducción de cuatro veces en los valores de las CI₅₀, sugiriendo que los efectos antagonistas, como los del PCP, están mediados vía la interacción con el receptor PCP asociado con el complejo ionóforo del receptor NMDA y que, por lo tanto, el MK-801 interacciona con los lugares de unión del PCP en el sistema nervioso central.

Así pues, análogos del PCP como el TCP, y el MK-801, han mostrado una muy alta afinidad hacia el receptor PCP acoplado al complejo receptor NMDA. A continuación se representan las estructuras de los ligandos PCP más conocidos:

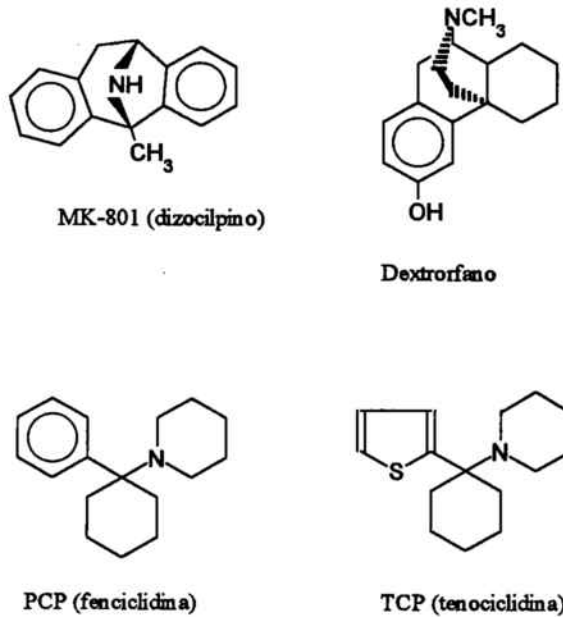


Figura 4.- Principales ligandos de tipo PCP.

2.2.- Subtipos de receptores PCP.

Quirion y col. (1987) describieron que, en preparaciones de cerebro de rata, los ligandos del receptor PCP tenían más de un lugar de unión. Así, el PCP se unía con alta afinidad al canal iónico asociado al receptor NMDA, como ya se ha comentado, pero también a un sitio de más baja afinidad que se marca con un análogo del TCP, el BTCP (N-[1-(2-benzo (b) tiofenil)ciclohexil]piperidina).

Así pues, el PCP tendría varios lugares de unión, que se han dividido en dos subtipos: PCP₁ y PCP₂ (Vignon y col., 1986; Rothman y col., 1989). El PCP₁ estaría asociado al canal iónico del receptor NMDA, mientras que el PCP₂ se consideraría acoplado al transportador de catecolaminas, concretamente, al de dopamina (Vignon y col., 1988). Sin embargo, se ha visto que el subtipo PCP₂ es en realidad una mezcla heterogénea de diferentes lugares de unión y que se requiere un estudio más detallado mediante técnicas diferentes a las de unión de radioligandos, a fin de dilucidar la función de cada uno de estos lugares (Rothman, 1994). Se han caracterizado receptores PCP en células cromafines de médula suprarrenal bovina (Rogers y Lemaire, 1990) y parece ser que en este tejido no se encuentran del subtipo PCP₁, convirtiéndose en un sustrato ideal para el estudio del subtipo PCP₂.

2.3.- Papel fisiológico de los receptores PCP.

Se sabe que la unión del PCP al receptor PCP₁ bloquea la activación del receptor NMDA (Thompson y col., 1985), con todas las repercusiones fisiológicas que ello comporta, mientras que su interacción con el subtipo PCP₂ produce un bloqueo de la captación de dopamina en las terminaciones nerviosas. Parece ser que parte de los efectos biológicos del PCP que podrían estar involucrados en sus propiedades psicomiméticas serían debidos a la inhibición de la captación de catecolaminas y serotonina en los terminales nerviosos (Smith y col., 1977; Vignon y Lazdunski, 1984; Bowyer y col., 1984; Johnson y Snell, 1985; Snell y col., 1988).

En un principio, se esperaba que los antagonistas no competitivos del receptor NMDA, como el MK-801, fueran anticonvulsivantes y presumibles ansiolíticos, aunque resultaron inducir, al igual que el PCP, cuadros psicoto- y simpaticomiméticos (Clineshmidt y col., 1982a, b, c).

La administración de ligandos PCP₁ como el propio PCP o el MK-801, induce en roedores un cuadro conductual característico, consistente en un aumento de la actividad motora, cabeceo (*head weaving*), desplazamiento circular alrededor de su eje horizontal con las patas traseras como centro de rotación (*turning behavior*), rodamiento (*body rolling*) y signos de ataxia (Tricklebank y col., 1989). A diferencia de los psicoestimulantes "clásicos" como la anfetamina, estos compuestos producen, a dosis más elevadas, un incremento en la ataxia. Por otra parte, dicha administración también provoca incrementos del metabolismo de serotonina y dopamina (Liljequist y col., 1991) en varias regiones del cerebro, así como cambios en los niveles de adrenalina y/o noradrenalina (Löscher y col., 1993), con lo que se pone de manifiesto una interacción compleja con los sistemas de monoaminas que bien podría ser mediada por los subtipos PCP₂.

Por otra parte, se ha descrito que los antidepresivos tricíclicos como la desipramina (DMI) tienen afinidad por el mismo lugar que el MK-801 en el canal iónico asociado al receptor NMDA (Wedzony y Golembiowska, 1993). Además, el MK-801 presenta un efecto sinérgico sobre el de la DMI, de manera que la administración conjunta de ambos compuestos provoca un mayor incremento en la concentración extracelular de dopamina que ambos administrados por separado. Debido a ello, se ha propuesto que los ligandos PCP₁ podrían mejorar la eficacia de los antidepresivos clásicos.

2.4.- El dextrorfano como ligando PCP.

Varios experimentos han demostrado que el dextrometorfano, clasificado como ligando sigma (ver apartado siguiente) y principio activo de muchos preparados antitusivos, presenta un amplio perfil anticonvulsivante (Tortella y col., 1989b; Kuko y Wada, 1989; Takazawa y col., 1990), así como propiedades neuroprotectoras en modelos experimentales de daño neuronal (Steinberg y col., 1988; George y col., 1988; Tortella y col., 1989a). Estos efectos, más que a la acción del dextrometorfano como tal sobre los receptores sigma o a su baja potencia antagonista sobre el receptor NMDA, se atribuyen a su metabolito fenólico, el dextrorfano.

El dextrorfano es un anticonvulsivante más potente (Tortella y col., 1989a; Wong y col., 1988; Aram y col., 1989; Chapman y Meldrum, 1989), neuroprotector (Choi, 1987; Choi y col., 1987; Monyer y Choi, 1988; Steinberg y col., 1988, 1989) y antagonista de los canales de calcio (Carpenter y col., 1988) en los mismos modelos animales.

Este metabolito podría ser el responsable de todas estas acciones del dextrometorfano ya que, en humanos, el dextrometorfano es metabolizado a dextrorfano en más de un 90 %. De hecho, se han descrito casos de toxicidad en niños y reacciones psicotomiméticas por sobredosificación de medicamentos a base de este principio activo.

Posteriores estudios demostraron que el dextrorfano presenta una elevada afinidad por los receptores PCP asociados al receptor NMDA ($K_D = 23$ nM) (Franklin y Murray, 1992), es decir, por los PCP₁, mientras que presenta una afinidad de baja a moderada por los lugares sigma₁ (Klein y Musacchio, 1989; Walker y col., 1990). Estos hallazgos, unidos al hecho de que los efectos observados *in vivo* coinciden con los que presentan los antagonistas no competitivos del receptor NMDA como el PCP o el MK-801, indican que el dextrorfano es un potente ligando PCP.

3.- LOS RECEPTORES SIGMA.

3.1.- Perspectiva histórica.

El receptor sigma (σ) fue propuesto en 1976 por Martin y col. para dar una explicación a las acciones del compuesto (\pm)-SKF 10047 (N-alilnormetazocina) y benzomorfanos racémicos relacionados.

De estos compuestos se sabía que inducían un cuadro conductual característico en el perro, como es el delirio canino, y que producían efectos psicomiméticos en humanos (Haertzen, 1970; Keats y Telford, 1964). Posteriores investigaciones revelaron que el (\pm)-SKF 10047 se unía a tres tipos de lugares de unión:

- 1.- A receptores opioides mu (μ) y kappa (κ) (Mangan y col., 1982).
- 2.- Al receptor PCP (Zukin y col., 1986).
- 3.- Al receptor sigma propiamente dicho (Quirion y col., 1987).

Los receptores sigma se clasificaron posteriormente como sensibles al haloperidol e insensibles a la etorfina y a la naloxona. Posteriormente, como se explicará más adelante, esta clasificación se hizo más compleja.

3.2.- Propiedades de los receptores sigma.

En un principio, cuando fueron descubiertos en 1976, se pensó que los receptores sigma eran un subtipo de receptores opioides. Hallazgos posteriores demostraron que no era así debido a que:

- Los receptores opioides son estereoselectivos para los isómeros (-) de los narcóticos del opio y derivados, mientras que los receptores σ son estereoselectivos para los isómeros (+).
- La naloxona, antagonista opioide, es incapaz de antagonizar los efectos tanto *in vivo* como *in vitro* de los ligandos σ (Brady y col., 1982).

Con estos dos descubrimientos quedaba claro que los receptores sigma no eran un subtipo de receptor opioide.

Posteriormente, algunos investigadores afirmaron que el receptor sigma no era más que el receptor PCP, basándose en que el [^3H]PCP era desplazado de sus lugares de unión por la (+)-N-alilnormetazocina (Mendelsohn y col., 1985; Zukin y col., 1984). Por este motivo los receptores sigma habían sido llamados "sigma opioide/receptor PCP" (Zukin y col., 1984). Sin embargo, el patrón de selectividad de la unión de la [^3H](+)-N-alilnormetazocina difiere del patrón que muestra el [^3H]PCP, demostrando que estos compuestos se unen a sitios diferentes. Por ejemplo, antipsicóticos como el haloperidol (también ligando sigma), desplazan con elevada potencia la unión de la [^3H](+)-N-alilnormetazocina, mientras que son muy débiles o inactivos frente a la unión del [^3H]PCP (Tam, 1983; Tam y Cook, 1984). De manera inversa, el PCP desplaza muy poco la unión del [^3H]haloperidol (Tam y Cook, 1984; Downes y col., 1986; Itzhak, 1987).

Los receptores σ y PCP también pueden diferenciarse por su distribución anatómica, ya que los lugares de unión para la [^3H](+)-N-alilnormetazocina y para el

[³H]PCP se concentran en áreas diferentes del cerebro (Gundlach y col., 1985; Largent y col., 1984; McLean y Weber, 1988; Sircar y col., 1986; Gundlach y col., 1986). Tam (1985) indicó otras diferencias entre la unión del [³H]PCP y la [³H](+)-N-alilnormetazocina, como son la sensibilidad de la unión del [³H]PCP al ión sodio, y la baja afinidad y poca estereoselectividad mostrada por los receptores PCP frente a la unión del y la (+)-etilcetociclazosina.

Con todo ello quedó bien claro que la [³H](+)-N-alilnormetazocina se unía a dos lugares diferentes, uno sensible al haloperidol (que se denominó receptor σ) y otro sensible al PCP (el receptor PCP, Quirion y col., 1987).

3.3.- Receptores sigma y psiquiatría.

Los efectos psicotomiméticos inducidos por los ligandos sigma sugerían que estos receptores podrían estar involucrados en la fisiopatología de algunos trastornos psiquiátricos. Lo que no estaba muy claro era si los efectos producidos por estos compuestos eran atribuibles, al menos en parte, a su afinidad por los receptores sigma.

En 1990, Musacchio postuló que estos efectos estarían más bien relacionados con la activación de los receptores κ o de los receptores PCP. Un año más tarde, Su (1991) corroboraba estos datos y concluía que, si los efectos psicotomiméticos inducidos por los ligandos σ levorotatorios parecían estar relacionados con el receptor κ , los inducidos por los ligandos σ dextrorotatorios serían atribuibles, al menos en parte, a su afinidad por el receptor σ .

La implicación de los receptores σ en la esquizofrenia se basa en la alta afinidad que presenta el haloperidol por los mismos y su utilidad clínica como neuroléptico. La afinidad de esta butirofenona por el receptor σ es aún más alta que la que presenta para los receptores dopaminérgicos. Posteriormente se ha demostrado que, tanto *in vivo* como *in vitro*, en cerebro de rata y cobayo, la proporción más alta de unión del

[³H]haloperidol correspondería al receptor σ . Lo mismo ha sido demostrado en humanos utilizando [¹⁸F]haloperidol mediante tomografía de emisión de positrones (Schlyer y col., 1992). De este modo, durante años, el haloperidol fue utilizado como el ligando con más alta afinidad y selectividad disponible, siendo empleado en numerosos estudios como radioligando.

La implicación potencial de los receptores σ en la esquizofrenia viene respaldada por estudios *post-mortem* que muestran una reducción en la densidad de lugares σ en el córtex y en el cerebelo de pacientes esquizofrénicos (Shibuya y col., 1992). De todos modos, la significación clínica de este estudio es todavía dudosa ya que la mayoría de estos enfermos habían estado tratados con neurolépticos y es bien sabido que el tratamiento crónico con haloperidol induce una *down-regulation* de los receptores sigma (Reynolds y col., 1991).

Debido a ello, el valor terapéutico de los ligandos σ selectivos en la esquizofrenia todavía no ha quedado establecido. Algunos investigadores han cuestionado la utilidad terapéutica de estos compuestos, sugiriendo que el receptor σ podría ser responsable de algunos de los efectos indeseables (como los extrapiramidales) producidos por los neurolépticos (Goldstein y col., 1989).

El hecho de que algunos antidepresivos como la sertralina, la fluoxetina, el opipramol, el deprenilo y la clorgilina tengan una afinidad alta por el receptor σ ha llevado a pensar que este receptor podría estar involucrado en trastornos afectivos importantes. El tratamiento crónico con imipramina o fluoxetina provoca una disminución en la densidad de receptores σ del estriado, hipocampo y córtex de rata (Shirayama y col., 1993).

La síntesis de antagonistas σ selectivos como el neuroléptico remoxipride o el NE-100 (N,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoksi)fenil]-etilamina monoclóhidrato), que presenta una muy baja afinidad por los receptores dopaminérgicos y antagoniza los cuadros psicotomiméticos inducidos por agonistas σ (Okuyama y col., 1993), permite concluir que los ligandos σ son de utilidad en el tratamiento de la esquizofrenia.

3.4.- Subtipos de receptores sigma y distribución en el SNC.

A raíz de varios estudios bioquímicos se propuso la existencia de dos subtipos de receptor σ (Musacchio y col., 1989). La nomenclatura actual reconoce como mínimo la existencia de dos subtipos: σ_1 y σ_2 (Quirion y col., 1992). Según esta clasificación, compuestos como la (+)-N-alilnormetazocina ((+)-SKF 10047), la (+)-pentazocina y el JO-1784 ((+)-ciclopropil-metil-N-metil 1,4-difenil-1-il-but-3-en-1-ilamina) serían ligados selectivos σ_1 , mientras que otros como el DTG (1,3-di-(2-tolil)guanidina), el (+)-3-PPP (3-[3-hidroxifenil]-N-(1-propil)-piperidina) y el haloperidol poseen una afinidad similar por los dos. Esta clasificación en σ_1 y σ_2 se resume en la siguiente tabla:

Ligando o ensayo	σ_1	σ_2
Ligandos selectivos		
(+)-Pentazocina	afinidad alta	afinidad baja
(+)-SKF 10047	afinidad de moderada a alta	afinidad muy baja
JO-1784	afinidad alta	afinidad baja
Carbetapentano	afinidad alta	afinidad muy baja
Dextrometorfano	afinidad de moderada a alta	afinidad muy baja
Ligandos no selectivos		
Haloperidol	afinidad alta	afinidad alta
DTG	afinidad alta	afinidad alta
(+)-3-PPP	afinidad alta	afinidad de moderada a alta
(-)-Pentazocina	afinidad de baja a moderada	afinidad de baja a moderada
(-)-SKF 10047	afinidad baja	afinidad baja
Naloxona	inactiva	inactiva
Otras características		
Sensibilidad a fenitoína	sí	no
Sensibilidad a GTP	sí (dependiendo del pH y tampón)	no
Disminución en la unión después de tratamiento subcrónico con haloperidol	sí (también después de la administración aguda del metabolito reducido del haloperidol)	no
Radioligandos		
	[³ H](+)-pentazocina	[³ H]DTG (en presencia de (+)-pentazocina, SKF 10047 o dextralorfano)

Tabla I.- Clasificación y diferenciación de los receptores σ_1 y σ_2 .

Los estudios autorradiográficos con la (+)-pentazocina, la (+)-N-alil-normetazocina y el DTG marcados han mostrado una gran heterogeneidad en la distribución de los receptores σ_1 y σ_2 en las diferentes zonas del encéfalo (McCann y col., 1994). Dicha distribución viene respaldada por datos electrofisiológicos que muestran respuestas diferentes a la (+)-pentazocina, al DTG y al JO-1784 en las diferentes zonas.

Sin embargo, varios trabajos indican la posible existencia de más de dos subtipos. Por ejemplo, el pretratamiento con toxina pertussis suprime la potenciación de la respuesta a NMDA inducida por una dosis baja de JO-1784, pero no la inducida por la (+)-pentazocina (Monnet y col., 1994). Esto sugeriría que el JO-1784 potencia la respuesta a NMDA vía un receptor σ acoplado a una proteína $G_{i/o}$, mientras que la (+)-pentazocina lo haría vía un receptor acoplado a otro sistema de transducción distinto al de las proteínas G. De hecho, trabajos previos mostraban que la unión de la [3 H]pentazocina no se ve modificada por la presencia de GTP ni de Gpp(NH)p (análogo estable del GTP) y que algunos efectos de la (+)-pentazocina estaban mediados por un receptor diferente al σ_1 .

Más recientemente, se ha propuesto la existencia de un subtipo de receptores σ_3 , por la cual el DTG, que presenta alta afinidad por los subtipos σ_1 y σ_2 , presentaría una baja afinidad. Este subtipo sería activado preferentemente por las 1-fenil-3-amino-1,2,3,4-tetrahidronaftalenos (1-fenil-3-aminotetralinas), por el haloperidol y por la spiperona, y se ha visto que afecta a la actividad tirosina hidroxilasa y a la síntesis de dopamina en estriado de roedores (Booth y col., 1993).

También se ha descrito un cuarto lugar de unión σ que muestra alta afinidad por compuestos relacionados con la ariletildiamina, como el BD-737 y el BD-1008, afinidad moderada por la forma reducida del haloperidol y baja afinidad por el haloperidol y el DTG (Bowen y col., 1995). Así, este lugar sería el único por el que el haloperidol presentaría baja afinidad. Sin embargo, los subtipos σ_3 y los lugares sensibles a ariletildiaminas requieren ser estudiados en más profundidad.

Estudios autorradiográficos con el [^3H](+)-3-PPP y el [^3H]haloperidol han mostrado que los receptores σ se hallan concentrados en zonas implicadas en la regulación de emociones y funciones motoras, como el sistema límbico y el tronco cerebral, respectivamente. Además, se han encontrado densidades significativas de receptores σ en otras áreas del sistema nervioso central, como la sustancia nigra, el cerebelo, etc. (Gundlach y col., 1986; Weber y col., 1986).

En lo que respecta a tejidos periféricos, se han encontrado poblaciones considerables de receptores σ (Wolfe y col., 1989), aunque son mucho menos abundantes que en el sistema nervioso central.

A continuación, se muestran las estructuras moleculares de los principales ligandos sigma:

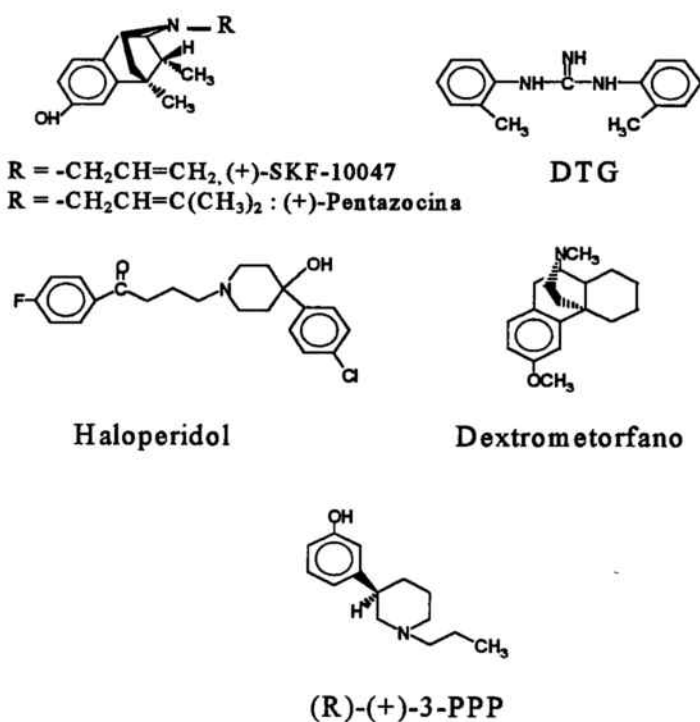


Figura 5.- Principales ligandos sigma.

3.5.- Papel fisiológico de los receptores sigma.

Se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar el papel fisiológico de los receptores sigma (para revisión, ver Debonnel, 1993). Sin embargo, los primeros estudios se llevaron a cabo con ligandos poco selectivos y a elevadas concentraciones, con lo que los numerosos efectos descritos atribuidos a la activación de los receptores σ son dudosos. En particular, muchos de estos efectos eran debidos a la afinidad de estos ligandos por el lugar PCP (Malouf y col., 1988) y no a la interacción con los receptores σ .

Es por ello que se explica el papel fisiológico de estos receptores centrándose en la descripción de los efectos que inducen sobre las neurotransmisiones glutamatérgica y dopaminérgica, ya que éstas no pueden ser confundidas con un efecto mediado por el receptor PCP.

3.5.a.- Interacción con las respuestas mediadas por el NMDA.

Como ya se ha mencionado, hasta hace pocos años no se disponía de ligandos σ selectivos y de alta afinidad (como el (+)-3-PPP y el DTG). Estos ligandos han sido estudiados en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, mostrándose capaces de modular la respuesta NMDA (para revisión, ver Debonnel y de Montigny, 1996).

Los efectos de estos compuestos sobre la actividad neuronal inducida por el NMDA se han comparado con la inducida por la activación de los otros subtipos de receptores glutamatérgicos. Así, dosis bajas de DTG potenciaban las respuestas inducidas por el NMDA, pero no las mediadas por los otros receptores glutamatérgicos. Otros ligandos σ producían efectos similares, como la (+)-pentazocina o el JO-1784 y por ello se les denominó *agonistas* σ .

Por otra parte, el haloperidol, el (+)-3-PPP, el BMY-14802 (α -(4-fluorofenil)-4-(5-fluoro-2-pirimidinil)-1-piperazino butanol) y el NE-100 (N,N-dipropil-2-[4-metoxi-3-(2-feniletoksi)fenil]-etilamina·HCl) no eran capaces de potenciar la respuesta NMDA, sino que revertían la potenciación antes descrita y, por ello, se les denominó *antagonistas* σ .

Una particularidad de las curvas dosis-respuesta de la potenciación de la actividad NMDA obtenidas con todos los agonistas σ era que éstas tenían forma de campana. Esto indica que la potenciación de la respuesta inducida por el NMDA producida por estos agonistas se incrementa de forma dosis-dependiente en un margen de dosis bajas mientras que, una vez se ha alcanzado la máxima potenciación, decrece progresivamente a dosis más altas. Esta disminución en la potenciación de la respuesta a NMDA a dosis altas de ligandos σ se debe a la pérdida de selectividad de estos compuestos por el receptor σ , pero no a la desensibilización de los mismos.

Además, se ha visto que, en cultivos de células neuronales, los ligandos σ inhiben de forma no competitiva la unión del [3 H]TCP, con unas CI_{50} que se correlacionan con sus afinidades respectivas por los receptores σ_1 (Yamamoto y col., 1995). Estos resultados indicaban que los ligandos σ modulan *in vivo* el complejo receptor NMDA-canal iónico de forma indirecta, probablemente a través del subtipo de receptores σ_1 .

3.5.b.- Interacción con el sistema dopaminérgico.

Desde su descubrimiento, se ha sugerido la posibilidad de la interacción de los receptores σ con el sistema dopaminérgico. Martin y col., (1976) ya apuntaban que la actividad σ podía involucrar un mecanismo dopaminérgico. No debe olvidarse, sin embargo, que la mayoría de los ligandos σ utilizados o sus primeros metabolitos tienen, además de afinidad por los receptores σ , una elevada afinidad por los receptores PCP y/o dopaminérgicos.

Por lo tanto, las interacciones entre receptores σ y neurotransmisión dopaminérgica no están completamente esclarecidas debido, principalmente, a la falta de selectividad de algunos de los ligandos σ . Por ejemplo, el (+)-3-PPP posee una relativa

afinidad por el autorreceptor dopaminérgico. No obstante, parece ser que varios agonistas σ incrementan la liberación basal de las neuronas dopaminérgicas y la liberación de dopamina en algunas áreas inervadas por el sistema dopaminérgico.

3.6.- Papel de los receptores sigma en el conducto deferente de ratón.

El (+)-3-PPP, ligando selectivo σ , potencia las contracciones neurogénicas (inducidas por estimulación eléctrica) en el conducto deferente de ratón (Campbell y col., 1987). Posteriormente, Kennedy y Henderson (1989) describieron que el (+)-3-PPP inhibía dichas contracciones en la misma preparación, pero que si se bloqueaban los receptores dopaminérgicos D_2 con sulpiride las potenciaba. Por otra parte el haloperidol (antagonista mixto σ_1 y σ_2) potenciaba la respuesta neurogénica a concentraciones entre 1 y 10 μM mientras que a concentraciones más altas la inhibía. Estos resultados, sumados al hecho de que el DTG tampoco tenía efecto sobre dicha respuesta, permitieron concluir que dicha potenciación se llevaba a cabo mediante la acción en un lugar diferente a los receptores sigma descritos hasta el momento.

Además del (+)-3-PPP, la N-alilnormetazocina también potencia las contracciones neurogénicas en esta preparación (Matsuno y col., 1993) donde, como es bien sabido, predomina la neurotransmisión por ATP. A diferencia de los resultados obtenidos frente a noradrenalina en arteria caudal de rata (Massamiri y Duckles, 1990; 1991) y en conducto deferente de rata (Fox y col., 1991) con algunos ligandos σ y PCP (ver apartado P.3.4), esta potenciación es estereoselectiva (el isómero (+) es mucho más potente que el (-)) y el MK-801 (ligando selectivo PCP) no tiene efecto sobre ésta.

Dicha potenciación en el deferente de ratón se correlaciona con la capacidad de estos compuestos para inhibir la unión de la [^3H](+)-N-alilnormetazocina, marcador sigma. Estos datos permitían deducir que la potenciación de las contracciones neurogénicas inducida por los ligandos σ en el conducto deferente de ratón estaba mediada por receptores σ sensibles a benzomorfanos (ya que el DTG, no benzomorfanos,

inhibe las contracciones), a rimcazol e insensibles a haloperidol. La estimulación de estos receptores a benzomorfanos causaría una potenciación de la neurotransmisión por ATP.

Posteriormente, los mismos autores (Matsuno y col., 1996) demostraron que estos compuestos también potenciaban la contracción inducida por la aplicación de ATP exógeno mediante la activación de un subtipo de receptor σ diferente al σ_1 y al σ_2 que era inhibida por antagonistas putativos σ como el haloperidol y el rimcazol. El (+)-3-PPP se mostraba como el más efectivo mientras que, sin embargo, entre los benzomorfanos (pentazocina y N-alilnormetazocina) eran más potentes las formas (-) que las (+). Esta diferencia podría deberse, sin embargo, a que al estimular eléctricamente el deferente de ratón también se libera noradrenalina y la potenciación observada podría deberse a un aumento del efecto de la NA. De hecho, el TCP, que no presenta afinidad por los receptores σ , también potencia las contracciones neurogénicas en el deferente de ratón (Campbell y col., 1987)

4.- TRANSPORTE DE LA NORADRENALINA.

4.1.- Generalidades.

La noradrenalina y adrenalina circulantes son acumuladas por diferentes tejidos (Axelrod y col., 1959). El corazón y el bazo acumulan catecolaminas gracias principalmente a un sistema de transporte (*uptake*) de alta afinidad que se encuentra en las terminaciones nerviosas. En el sistema nervioso central, este sistema de transporte constituye uno de los mecanismos más importantes para la neurotransmisión. Las células cromafines de la médula suprarrenal también presentan un sistema de transporte de alta afinidad que ha sido caracterizado y comparado con el existente a nivel central (Kenigsberg y Trifaro, 1980; Jaques y col., 1984; Banerjee y col., 1987; Rogers y Lemaire, 1991). El transporte puede ser de tipo neuronal (tipo I) o no neuronal (tipo II):

Transporte neuronal: tiene lugar principalmente en las terminaciones nerviosas, las cuales pueden recaptar hasta un 80 % de la noradrenalina liberada, reduciendo de este modo la cantidad de moléculas de neurotransmisor capaces de interactuar con los receptores. Se caracteriza por ser un transporte saturable y competitivo, con estereoselectividad por las formas (-). Este tipo de transporte es inhibido por la cocaína, la amfetamina y otras aminas simpaticomiméticas y por algunos antidepresivos tricíclicos (imipramina, amitriptilina, desipramina...) y neurolépticos. La noradrenalina captada pasa

al citoplasma de la neurona y es transportada activamente hacia los gránulos de almacenamiento del neurotransmisor, donde queda de nuevo disponible para ser liberada por otro estímulo nervioso.

Transporte no neuronal: Otras células no neuronales también captan las catecolaminas mediante un sistema que presenta una menor afinidad por las mismas pero que está más ampliamente distribuido. Este transporte, sin embargo, es difícil de saturar. Se inhibe por metabolitos metilados, por la fenoxibenzamina y por los esteroides. Presenta más afinidad por la adrenalina que por la noradrenalina y no muestra estereoespecificidad. Las aminas captadas por este mecanismo no son almacenadas, siendo metabolizadas por la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT).

4.2.- Factores que lo modulan en el conducto deferente.

4.2.a.- Dependencia del sodio.

El transportador de aminas asociado a la membrana axónica de las neuronas noradrenérgicas requiere la presencia del ión sodio para transportar la noradrenalina (Iversen y Kravitz, 1966; Bogdanski y Brodie, 1966). Dicho sistema de transporte presenta las propiedades cinéticas de una reacción enzimática secuencial para dos sustratos, en la cual el Na^+ y la noradrenalina actúan como cosustratos de forma cooperativa (Sammet y Graeffe, 1979; Friedrich y Bönisch, 1986). La dependencia de sodio del transporte de la noradrenalina implica que la inhibición de dicho transporte por sustratos alternativos a la noradrenalina es también dependiente de sodio. La inhibición competitiva de la captación y la dependencia del Na^+ son propiedades comunes tanto en sustratos como en inhibidores “no transportados” de dicho mecanismo (Zeitner y Graefe, 1986). Entre los sustratos alternativos se encuentran aminas como el (-)-metaraminol y la (+)-anfetamina, mientras que la desipramina, la nisoxetina, la nomifensina y la cocaína actúan como inhibidores “no transportados”.

4.2.b.- Modulación por colina.

Se ha demostrado que la colina, utilizada para sustituir al sodio en experimentos que requieran la ausencia de este ión, inhibe la captación neuronal de [³H]noradrenalina en el conducto deferente de la rata, y que esta inhibición es más pronunciada cuanto mayor es la concentración de Na⁺ en el medio externo. Existe pues una interacción competitiva entre la noradrenalina y la colina por el transportador. Dicho de otro modo, la colina también actúa como inhibidor de tipo mixto del transporte de noradrenalina en contra de la acción facilitadora que posee el sodio y actúa como substrato del transportador (Keller y Graefe, 1979). La colina provoca también una aceleración de la difusión en experimentos realizados para medir la salida de [³H]noradrenalina. Así pues, estas observaciones deben tenerse en cuenta cuando la colina se utilice a altas concentraciones (milimolares) como sustituto del sodio en medios con déficit de este ión.

4.2.c.- Dependencia del cloruro.

La captación neuronal de noradrenalina depende también de la presencia del ión Cl⁻ (Sánchez-Armass y Orrego, 1977) en el medio, ya que la ausencia del mismo provoca la inhibición de la captación de la noradrenalina.

A nivel del conducto deferente, Friedrich y Bönisch (1986) demostraron que, incubando los órganos en un medio carente de Cl⁻, el índice inicial de captación de [³H]noradrenalina era sólo el 12 % del obtenido en medios con concentraciones importantes de este anión. Se demostró que la presencia de Cl⁻ extracelular estimula la captación neuronal disminuyendo la K_m (constante de Michaelis- Menten) y aumentando la V_{max} (velocidad máxima) del sistema de transporte para la noradrenalina.

Asimismo, se observa una sensibilidad a la concentración de Cl⁻ en el efecto de los inhibidores del transporte de noradrenalina como la desipramina y la cocaína, siendo menos potentes en ausencia de este ión. El efecto inhibitorio de la desipramina presenta

una sensibilidad más elevada que la cocaína, lo cual hace pensar que podrían existir diferencias en el estado del transportador sobre el que actúan estos compuestos (Ungell y col., 1989).

4.2.d.- Efecto del litio.

En experiencias llevadas a cabo en un medio donde se ha utilizado litio para sustituir total o parcialmente al sodio, se ha podido observar, sólo en la parte prostática, una potenciación de la captación neuronal de [³H]NA. Este efecto era evitado al preincubar los tejidos con mioinositol, sugiriéndose un papel de los metabolitos del fosfatidilinositol en el proceso de captación neuronal (Pekelman y de Avellar, 1992). Sin embargo, otros trabajos realizados con conductos deferentes que procedían de ratas tratadas de forma crónica con litio no describen alteraciones en la liberación ni en la captación de la [³H]NA, ni tampoco en la funcionalidad de los receptores α_1 ni α_2 (Finberg y col., 1992).

4.2.e.- Efecto de la edad.

En el conducto deferente, la captación neuronal de noradrenalina es mayor en la porción epididimal que en la prostática. Sin embargo, es en la parte prostática y no en la epididimal donde se observa una pérdida en la función de captación de noradrenalina en relación directa con la edad (de Avellar y col., 1990). Así, el envejecimiento de los animales reduce los valores de V_{max} en la captación de [³H]NA en la parte prostática mientras que no la modifica en la porción epididimal. También se observa una disminución del número máximo de lugares de unión (B_{max}) para la [³H]desipramina relacionada con la edad, aunque también sólo en la parte prostática. Se puede decir pues que, en la fracción prostática, la edad disminuye la eficacia de la captación neuronal de noradrenalina mediante una reducción del número de lugares de unión para la [³H]desipramina (Pekelmann y de Avellar, 1992).

4.2.f.- Tratamiento con inhibidores de la captación neuronal.

Se ha descrito la aparición de una desensibilización de los receptores adrenérgicos α_1 tras el tratamiento a largo plazo con fármacos inhibidores de la captación neuronal como la nomifensina, la desipramina y la nisoxetina (Sallés y Badia, 1993). Esta desensibilización podría explicarse por el subsiguiente aumento de los niveles de noradrenalina cerca del receptor. De todos modos, esta pérdida depende también de otros factores como son la densidad y simetría de las inervaciones, así como de la amplitud de la vesícula sináptica.

4.3.- Marcaje de los sistemas de transporte de noradrenalina.

Los intentos para marcar los lugares de captación de noradrenalina no fueron en sus inicios tan exitosos como los encaminados a marcar transportadores de otros neurotransmisores, como la serotonina. En la década de los 80 se propuso la [^3H]desipramina (o [^3H]desmetilimipramina o [^3H]DMI) como un marcador adecuado de los lugares de captación de noradrenalina en cerebro de rata (Lee y Snyder, 1981; Rehavi y col., 1981). De todos modos, la [^3H]DMI presenta un elevado porcentaje de unión inespecífica (Lee y Snyder, 1981; Lee y col., 1982; Slater y col., 1982; Rapp y col., 1987; Backstrom y col., 1989) además de unirse a otros lugares de baja afinidad.

El [^3H]mazindol también ha sido utilizado para marcar estos lugares en cerebro de rata, pero tiene el inconveniente de que se une con elevada afinidad a los lugares de captación de la dopamina (Javitch y col., 1984, 1985), teniéndose que emplear inhibidores selectivos de la captación de dopamina cuando se desee marcar sólo los transportadores de noradrenalina.

La nisoxetina (N-metil-3-(*o*-metoxifenoxi)-3-fenilpropilamina) es un inhibidor potente y selectivo de la captación de noradrenalina, resultando aproximadamente 1.000 veces más potente bloqueando la captación de noradrenalina que la de serotonina, y 400

veces más potente que inhibiendo la captación de dopamina (Wong y Bymaster, 1976; Wong y col., 1982; Richelson y Pfenning, 1984). Además, la nisoxetina presenta una muy baja o nula afinidad para la mayoría de receptores para los principales neurotransmisores (Richelson y Nelson, 1984; Wander y col., 1986). Su simple estructura química junto a sus características farmacológicas la hacen una gran candidata para su utilización en estudios relacionados con la medida de los lugares de captación de noradrenalina. Se suele utilizar en forma tritiada, ya que marcada con ^{11}C presenta mayor unión inespecífica.

Se han sintetizado compuestos derivados de la nisoxetina a fin de aumentar su potencia y mejorar sus características como marcador de los transportadores de noradrenalina. Uno de ellos es la tomoxetina (Gehlert y col., 1993), que posee una potencia ligeramente superior a la nisoxetina. Otro de estos compuestos es la (R)-tionisoxetina (Gehlert y col., 1995), que presenta una potencia de 2 a 3 veces mayor que la tomoxetina.

4.4.- Efecto de los ligandos sigma y PCP sobre el transporte de catecolaminas.

Debido a los efectos conductuales que provocaba la fenciclidina *in vivo*, se formuló la hipótesis de que parte de sus propiedades psicomiméticas podrían ser debidas al bloqueo de la captación de catecolaminas y/o serotonina en los terminales nerviosos. De hecho, el PCP provoca, en el mismo margen de dosis que se consideran anticonvulsivantes y neuroprotectoras (bloqueo no competitivo del receptor NMDA), efectos que se atribuyen al bloqueo de la captación de dopamina como son hipotermia, disminución de los niveles de prolactina y elevación de los niveles extracelulares de dopamina (Pecknick y col., 1989a, 1989b, 1991).

El PCP inhibe la captación de catecolaminas en diversas preparaciones de sinaptosomas de cerebro de rata (Smith y col., 1977; Bowyer y col., 1984; Vignon y Lazdunski, 1984; Johnson y Snell, 1985). De manera análoga, el MK-801 resultó capaz de inhibir, aunque con una potencia tres veces menor que el PCP, la captación de

noradrenalina tritiada en sinaptosomas de hipocampo de rata (Snell y col., 1988). De estos resultados se concluyó que, en principio, estos efectos inhibidores de la captación deberían estar mediados por los lugares PCP₂ ya que el MK-801, más selectivo por los lugares PCP₁ (canal iónico asociado al receptor NMDA), mostraba una menor potencia que el PCP.

Además de los ligandos PCP, se encontró que algunos de los compuestos conocidos como ligandos sigma eran también capaces de inhibir la captación de [³H]noradrenalina en sinaptosomas de cerebro de rata, con una buena correlación con su capacidad para inhibirla asimismo en cultivos de células cromafines de médula suprarrenal bovina (Rogers y Lemaire, 1991). Los mismos autores (Rogers y Lemaire, 1992) demostraron la existencia de una interacción de estos compuestos con el transportador de noradrenalina en médula suprarrenal bovina mediante ensayos de unión utilizando [³H]DMI como marcador de dicho transportador. Las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) para inhibir la captación de [³H]noradrenalina y la unión de la [³H]DMI en las diferentes preparaciones se muestran en la tabla II, junto a los datos correspondientes a inhibidores "clásicos" del *uptake* (Rogers y Lemaire 1991, 1992).

Se ha demostrado que las células cromafines no contienen receptores PCP₁ y, por lo tanto, este tejido resulta de gran utilidad para estudiar los efectos de estos ligandos sobre la captación de catecolaminas que, como ya se ha mencionado, parece estar relacionada con el subtipo de receptor PCP₂. Se ha demostrado que el lugar PCP₂ es, en cerebro, el responsable de la inhibición de la captación de la dopamina, y que puede marcarse con un análogo del TCP, el BTCP (N-[1-(2-benzo(b)tiofenil)ciclohexil]piperidina), el cual inhibe con gran potencia dicha captación (CI₅₀ = 13,9 nM; Vignon y col., 1988). El BTCP, sin embargo, no inhibía de igual manera la captación de [³H]NA (CI₅₀ > 10 μM). De este hallazgo y del hecho que el MK-801 y el TCP se mostraran como potentes inhibidores de la captación de la [³H]NA y no la de la [³H]dopamina (Snell y Johnson, 1988), se abría la posibilidad de la implicación de otro receptor diferente al PCP₂ en la inhibición de la captación de la NA.

Así pues, los ligandos σ y PCP podrían tener una acción inhibitoria del uptake de NA a través de un lugar parecido al receptor σ_1 y diferente al lugar responsable de la captación de dopamina (PCP₂) (Rogers y Lemaire, 1991).

	CI ₅₀ (μ M)		
	UNIÓN [³ H]DMI CÉLULAS CROMAFINES	INH. UPTAKE [³ H]NA	
		SINAPTOSOMAS CEREBRO	CÉLULAS CROMAFINES
<i>Inhibidores del uptake</i>			
DESIPRAMINA	0,020 \pm 0,0003	0,03 \pm 0,009	0,01 \pm 0,002
NISOXETINA	0,040 \pm 0,0004	n.d.	n.d.
IMP RAMINA	0,100 \pm 0,017	n.d.	n.d.
COCAÍNA	20,0 \pm 1,66	n.d.	n.d.
<i>Ligandos σ</i>			
HALOPERIDOL	0,82 \pm 0,09	0,42 \pm 0,11	0,47 \pm 0,09
RIMCAZOL	1,20 \pm 0,067	1,96 \pm 0,78	4,03 \pm 0,28
(-)-BUTACLAMOL	6,41 \pm 0,83	4,06 \pm 0,89	5,11 \pm 0,12
DEXTROMETORFANO	12,0 \pm 1,11	1,73 \pm 0,31	0,51 \pm 0,02
(+)-3-PPP	19,9 \pm 2,04	0,82 \pm 0,07	0,50 \pm 0,08
(+)-SKF-10047	64,0 \pm 4,95	7,24 \pm 1,45	14,0 \pm 2,87
(-)-SKF-10047	92,0 \pm 5,25	20,5 \pm 2,46	38,3 \pm 6,04
DTG	inactivo	29,7 \pm 2,37	20,0 \pm 4,24
<i>Ligandos PCP</i>			
MK-801	15,0 \pm 1,3	4,90 \pm 1,34	1,92 \pm 0,18
FENCICLIDINA	41,9 \pm 2,67	0,17 \pm 0,09	0,24 \pm 0,07
TENOCICLIDINA	50,9 \pm 1,63	0,34 \pm 0,08	0,42 \pm 0,08

n.d. : datos no disponibles.

Tabla II.- Constantes de inhibición de ligandos σ y PCP sobre la unión de la [³H]DMI en células cromafines bovinas y sobre la incorporación de [³H]noradrenalina en la misma preparación y en sinaptosomas de cerebro de rata.

En lo que respecta a trabajos realizados con otros tejidos periféricos, Campbell y col. (1987) demostraron que el ligando selectivo σ (+)-3-PPP y el TCP (selectivo PCP) aumentaban las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en el conducto deferente aislado de ratón, atribuyendo este efecto a un aumento de la liberación de NA. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que en el conducto deferente de ratón predomina la

neurotransmisión por ATP y parece ser que la potenciación de la respuesta a este neurotransmisor por ligandos σ sí podría estar mediada por un subtipo de dichos receptores, aunque diferentes a los descritos hasta el momento (Matsuno y col., 1993, 1996)(ver apartado 3.6).

Vaupel y col. (1987) describieron una potenciación por PCP de las contracciones neurogénicas en conducto deferente de cobayo, donde predomina la NA como neurotransmisor, potenciaciones que eran antagonizadas por haloperidol y por BW 234U (antagonistas σ putativos).

Posteriormente, Fox y col., (1989) estudiaron los efectos del PCP en conducto deferente de rata, en cuya contracción existe un gran componente noradrenérgico, descubriendo que la curva concentración-respuesta a NA se desplazaba hacia la izquierda en presencia del mismo, mientras que la de oximetazolina (análogo de la NA no sustrato de captación) no se afectaba. Estos resultados descartaban que la potenciación fuera debida a una acción presináptica sigma que provocara un aumento en la liberación de NA, y apuntaban a la inhibición de la captación del neurotransmisor como posible mecanismo de acción.

Dos años más tarde, los mismos autores (Fox y col., 1991) demostraron que, en conducto deferente aislado de rata, la potenciación de las contracciones neurogénicas por PCP, (\pm)-pentazocina y (+)-SKF 10047 no era debida a una acción sobre los receptores sigma, ya que sus potencias no se correlacionaban con sus respectivas afinidades por los receptores σ del SNC. Además, el DTG, un potente agonista mixto σ_1 y σ_2 , no afectaba a dichas contracciones ni inhibía la potenciación por el resto de sustancias empleadas. Estas observaciones permitían descartar al conducto deferente de rata como una preparación útil para evaluar ligandos sigma, y apoyaban la hipótesis de la inhibición de la captación como mecanismo de potenciación de la noradrenalina por estos ligandos.

Finalmente, a nivel de otros órganos periféricos como la arteria caudal aislada y perfundida de rata (Massamiri y Duckles, 1990; 1991) el TCP, el MK-801 el (+)-SKF

10047 y el (+)-3-PPP potenciaban las contracciones inducidas por noradrenalina con un orden de potencias de $TCP > (+)\text{-}3\text{-PPP} > \text{MK-801} > (+)\text{-SKF 10047}$. La hipótesis de la inhibición del *uptake* neuronal de la NA por parte de estos compuestos se veía reforzada por el hecho que si se inhibía éste con cocaína la potenciación desaparecía, mientras que no se alteraba si se inhibía la captación no neuronal con deoxicorticosterona. La falta de correlación entre las potencias medidas y la afinidad de estos compuestos por los receptores σ permitía descartar de nuevo la participación de dichos receptores en el efecto potenciador.

Sin embargo, el haloperidol, el (\pm)-BMY 14802, el rimcazol y el DTG (ligandos σ) inhibían las respuestas a noradrenalina en aquella preparación, siendo el haloperidol el inhibidor más potente. En presencia de cocaína, el (+)-SKF 10047 (ligando σ) seguía inhibiendo, mientras que el MK-801 (ligando PCP) no modificaba la respuesta. Este hallazgo, junto al hecho de que las potencias inhibitoras sí se correspondían con la afinidad por receptores σ , permitía hipotetizar que el efecto inhibitor de las contracciones por NA en esta preparación sí podría deberse a un efecto σ .

Los ligandos σ y PCP anteriormente nombrados, excepto el DTG, también son capaces de inhibir la incorporación neuronal de [^3H]NA en la arteria caudal de rata, así como el *binding* de [^3H]DMI en secciones de cerebro de rata (Massamiri y Duckles, 1991). Sorprendentemente, el haloperidol, el BMY 14802, el rimcazol y el DTG, que inhibían las contracciones por NA en la arteria aislada, también resultaron capaces de inhibir la captación de [^3H]NA. Sin embargo, la potencia inhibitora de las contracciones era mayor que la inhibitora de la captación, sugiriendo que el efecto inhibitor podría deberse a una acción directa sobre el músculo liso. De hecho, existen trabajos que demuestran un antagonismo musculotrópico del haloperidol hacia las respuestas a NA y dopamina en conducto deferente de rata (Miranda y col., 1988) que podría enmascarar el posible efecto sobre la captación de catecolaminas.

La buena correlación existente entre la inhibición de la captación de [^3H]NA y la inhibición del *binding* de [^3H]DMI permitió sugerir que los ligandos sigma y PCP interaccionan de una forma compleja con el transportador de noradrenalina.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- OBTENCIÓN DE LOS CONDUCTOS DEFERENTES.

Los animales de laboratorio utilizados han sido ratas Sprague-Dawley macho, adultas, entre 250-300 gramos de peso (C.E.R.J., Le Génest, Francia). Los animales fueron estabulados bajo condiciones estándar de temperatura ($22 \pm 0,5$ °C) y mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (de 8 am a 8 pm) con libre acceso a pienso (Letica IPM-R20) y al agua de bebida. Las ratas permanecieron 24 horas en ayunas antes de ser utilizadas en los distintos experimentos.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante decapitación. Seguidamente, se colocaron sobre una mesa quirúrgica donde se les practicó una laparatomía media que dejaba al descubierto el paquete intestinal. Para poner los conductos deferentes al descubierto, se desplazaron los testículos desde su posición escrotal hasta la incisión del abdomen. Los conductos deferentes corresponden a las estructuras tubulares que parten del epidídimo, unido a los testículos, hasta la unión de próstata y vesículas seminales (fig.1). La extracción de los conductos se llevó a cabo en su totalidad, colocándose inmediatamente en solución de Krebs-Henseleit oxigenada (apartado 2.2) si se iban a utilizar en baño de órganos o en ensayos de captación de [^3H]noradrenalina. En el caso de que estuvieran destinados a la obtención de membranas para ensayos de *binding*, los deferentes se introdujeron en tampón Tris-sacarosa (apartado 3.3.b de esta sección).

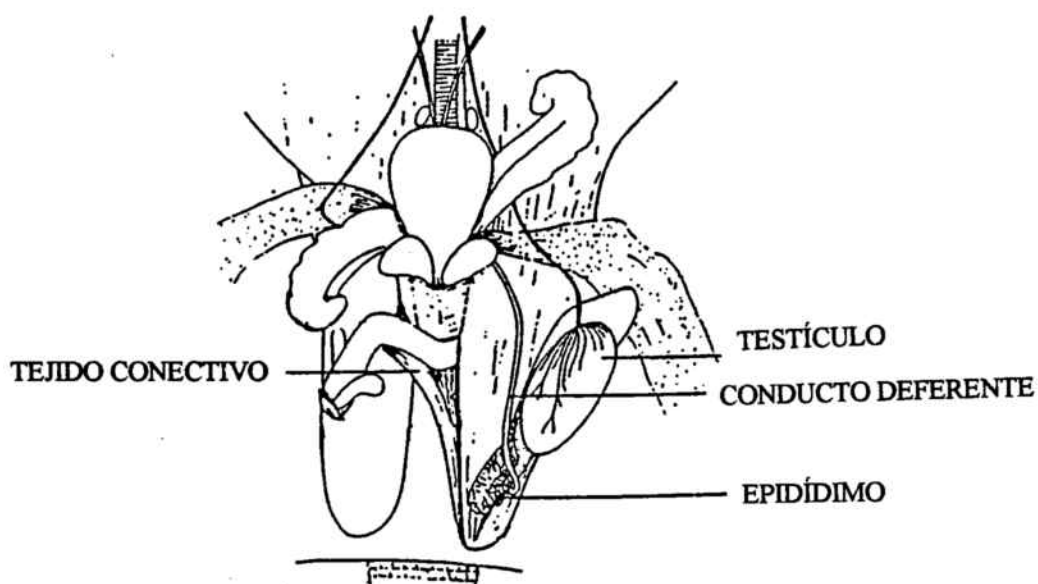


Figura 6.- Localización anatómica de los conductos deferentes

A continuación, se disponían en placas de Petri que contenían la misma solución y se procedía a una cuidadosa limpieza de tejido conectivo, grasa y vasos adheridos.

2.- ENSAYOS EN ÓRGANO AISLADO.

2.1.- Fundamento.

Para los ensayos en órgano aislado se ha utilizado el baño de órganos. Este montaje consiste en una copa de vidrio, llena de una solución salina fisiológica, que contendrá el tejido y que se encuentra conectada a un serpentín que comunica con un reservorio externo de solución salina fisiológica. Tanto la copa como el serpentín están rodeados de un baño de agua termostatada que permite regular la temperatura a la cual se realiza el experimento.

El tejido, en la mayoría de los casos, se fija al baño mediante un soporte adecuado y se mantiene oxigenado gracias al burbujeo, a través de una placa porosa que presenta la copa en su base, de aire, oxígeno o carbógeno (95 % O₂/5 % CO₂).

Los estudios en órgano aislado presentan una serie de ventajas sobre los practicados en animal entero o en fracciones subcelulares de éstos. Algunas de ellas son:

- Las funciones elementales intrínsecas de un órgano se pueden estudiar bajo condiciones controladas, por ejemplo, de composición del espacio extracelular (iones, eicosanoides,



MATERIALES Y MÉTODOS

hormonas, etc.) así como las condiciones bioquímicas y físicas de la respuesta (registro isométrico o isotónico, tensión de precarga definida, etc.).

- Se puede someter al órgano a condiciones extremas que no pueden conseguirse en el organismo intacto o son muy difíciles de conseguir. Por ejemplo, disminución de la temperatura, inducción de contracciones y relajaciones en el músculo liso, etc.
- Se eliminan interacciones con otros órganos y con los sistemas de homeostasis del organismo.
- Los resultados obtenidos con estos experimentos son, con frecuencia, fáciles de interpretar ya que no intervienen un gran número de factores bioquímicos y mecánicos.
- Las respuestas son fácilmente cuantificables y se pueden relacionar directamente con la concentración de fármaco en el medio ya que, como ya se ha dicho, no hay problemas de absorción ni de metabolismo antes de alcanzar la biofase.

Por otro lado, las ventajas frente a los experimentos realizados con homogeneizados de tejidos son:

- El órgano aislado, pero íntegro, puede realizar un trabajo fisiológico; por ejemplo, producción de orina en el riñón aislado, contracción, trabajo cardíaco, etc., mientras que el homogeneizado no.
- Por lo tanto, se pueden realizar comparaciones directas entre la respuesta del órgano aislado y su comportamiento en el organismo.

Sin embargo, la experimentación en órgano aislado presenta algunos inconvenientes respecto a otras técnicas. Por ejemplo, algunas desventajas frente a los ensayos *in vivo* son:

- Los resultados son difíciles de extrapolar al animal entero, ya que la farmacocinética es diferente a la que existe *in vivo*.
- La interacción entre sistemas del organismo puede ser importante en algunos procesos, mientras que en el baño de órganos se elimina, por ejemplo, la regulación hormonal.
- Se puede dañar el órgano o tejido durante la disección.
- Algunos órganos pueden verse afectados por problemas de difusión del oxígeno, substrato o fármaco.

2.2.- Montaje de los conductos deferentes en el baño de órganos.

Los conductos deferentes de rata, obtenidos y limpiados tal como se explica en el apartado 1 de esta sección, eran divididos en la porción epididimal y la prostática utilizándose, como ya se ha mencionado, la parte epididimal para estos experimentos, de una longitud aproximada de 1,5 cm. Para el montaje se ató un hilo de algodón a cada extremo del órgano y se anudó la parte más epididimal al gancho del soporte, se transfirió el órgano a la copa del baño (con un volumen constante de solución salina de 20 ml y temperatura de 37 °C) y, después de fijar el soporte al armazón del baño, se ató el hilo libre a la barra de un transductor de tensión isométrico (Letica TRI 110). Los transductores estaban conectados a amplificadores (Letica ISO 506) y éstos a un polígrafo registrador multicanal (Letica PolyGraph 4006).

Paralelamente, la tensión obtenida también era enviada, a través de un interfaz informático (Letica LE 60-100), a un ordenador PC-compatible que ejecutaba el programa PROTO5 (Letica Software Dept., BCN, España).

Los conductos deferentes así montados se sometían a una tensión de precarga de 400 mg y se dejaban estabilizar durante 60 min., realizándose un lavado cada 15 min.

Durante toda la experiencia se aplicó una aireación con carbógeno (95 % O₂/5 % CO₂) de forma continua y homogénea.

La solución salina fisiológica empleada para estos experimentos ha sido la solución de Krebs-Henseleit, cuya composición es:

Reactivo	Concentración (mM)	Gramos (o ml)/5 l
NaCl	119	34,75
KCl	4,6	1,75
CaCl ₂ (sol. 10 %)	2,5	14 ml
KH ₂ PO ₄ (sol. 10 %)	1,2	8,35 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O (sol. 10 %)	1,2	14,7 ml
NaHCO ₃	25	10,5
Glucosa	11,1	10,5
Agua bidestilada	c.s.	c.s.p. 5 l

Los compuestos en los que se ha indicado “sol. 10 %” se añaden a partir de disoluciones stock al 10 % de los mismos, conservadas en nevera.

2.3.- Respuestas inducidas por estimulación eléctrica.

2.3.a.- Introducción.

La estimulación eléctrica de un órgano provoca artificialmente la despolarización que en condiciones fisiológicas normales sería equivalente a la derivada de un potencial de acción. Como consecuencia, se produce la liberación de los neurotransmisores contenidos en las terminaciones sinápticas del tejido, los cuales irán a interaccionar con sus respectivos receptores y desencadenarán una determinada respuesta. Es por ello que a las respuestas inducidas por estimulación eléctrica se las denomine también respuestas neurogénicas.

Ambache y Zar (1971) fueron los primeros en sugerir que la noradrenalina (NA) no es el único neurotransmisor en el conducto deferente de la rata, idea que confirmaron posteriormente Euler y Hedquist (1975) debido a que la respuesta contráctil de este órgano a la estimulación eléctrica se puede desdoblar en dos componentes, una de las cuales no era adrenérgica. En 1980, Hirst y Neil sugirieron que la respuesta no adrenérgica podría ser debida a la acción de la NA sobre otro tipo de adrenerreceptores, a los que denominaron gamma-adrenerreceptores, que no serían bloqueados por los antagonistas α -adrenérgicos clásicos. Posteriormente, Gillespie y Macrae (1983) sugirieron que la NA sería la responsable del primer componente de la respuesta, mientras que el segundo componente sería debido a un segundo neurotransmisor (Mottram, 1988). Los trabajos de Meldrum y Bunstock (1983) y de Sneddon y Westfall (1984) en conducto deferente aislado de cobayo parecen confirmar que el ATP es el neurotransmisor responsable del primer componente tetánico, mientras que la NA lo sería del segundo.

De todos modos, los experimentos realizados en conducto deferente aislado de rata (Amobi y Smith, 1987) han demostrado que no se puede realizar una diferenciación tan clara sobre la naturaleza de los dos componentes de la respuesta contráctil de este órgano, ya que la importancia relativa del ATP y la NA como mediadores de las diferentes etapas de la respuesta tetánica varía en las diferentes especies animales.

2.3.b.- Protocolo experimental

Para realizar las experiencias con estimulación eléctrica, los conductos deferentes eran montados entre los electrodos de platino de estimulación de campo incorporados en unos soportes especiales. La solución salina utilizada fue la de Krebs-Henseleit descrita anteriormente.

Después del período de estabilización, se registró la contracción basal estimulando durante 5 min. con pulsos únicos (0,1 Hz, 0,5 ms, estimulador Grass S88) a voltaje supramaximal (20 V). Seguidamente, sin parar la estimulación, se añadía el fármaco a la concentración deseada y se registraba la respuesta durante 5 min. más. A

continuación se paraba la estimulación, se realizaban tres lavados consecutivos y pasados 15 min. se repetía el proceso con una concentración de fármaco mayor. Después de ensayar las concentraciones deseadas, se registraba la respuesta en ausencia de fármaco para determinar el grado de recuperación de la respuesta basal.

En experimentos preliminares, se eliminó el magnesio de la solución de Krebs-Henseleit para estudiar el efecto de este ión sobre la acción del MK-801 en las respuestas inducidas por estimulación eléctrica.

2.4.- Estimulación con noradrenalina exógena.

El protocolo seguido en los experimentos descritos a continuación ha sido el siguiente:

- 1.- Despolarización con KCl (80 mM) a fin de poder observar la reactividad y contracción máxima del órgano. Tres lavados. 15 min. de estabilización.
- 2.- Tres pulsos de sensibilización con NA 1,6 μ M, separadas entre ellos 10 min. Se descartaron los órganos que no respondieron de forma repetitiva a estos estímulos.
- 3.- Dos curvas concentración-respuesta acumulativas control a NA, separadas entre ellas 15 min.
- 4.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de fármaco, según se describe en los siguientes apartados.

Las diferentes concentraciones de noradrenalina se obtuvieron de diluciones en solución salina de una solución acuosa concentrada (3,2 mM) que contenía ácido ascórbico al 0,1 % para evitar la oxidación del neurotransmisor.

2.4.a.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina.

Las curvas concentración-respuesta acumulativas a NA se realizaron en ausencia (curvas control) y en presencia de diferentes concentraciones de MK-801, PCP (fenciclidina), TCP (tenociclidina), dextrorfano, dextrometorfano, haloperidol y (+)-3-PPP, los cuales se adicionaron a la copa del baño 10 min. antes de empezar las curvas. Después de cada curva, se efectuaban tres lavados seguidos y se dejaban 15 min. de recuperación antes de iniciar la siguiente.

2.4.b.- Curvas concentración-respuesta en presencia de yohimbina.

Finalidad.

A fin de determinar una posible implicación de los receptores adrenérgicos α_2 en la potenciación del efecto de la NA por el MK-801 se utilizó la yohimbina, un antagonista competitivo de dichos receptores. Asimismo, a fin de descartar un efecto *per se* de la yohimbina sobre las contracciones inducidas por NA exógena se realizaron curvas concentración respuesta a NA en presencia de este alcaloide en el medio (a una concentración de 0,13 μM). La yohimbina se añadía a la copa 10 min. antes de iniciar la curva a NA.

Protocolo experimental.

Para determinar el efecto de la yohimbina sobre la potenciación inducida por el MK-801 se añadía la yohimbina (0,13 μM) 5 min. antes de añadir el MK-801 (5,3 μM) y a los 5 min. de la adición de este último se efectuaba la curva concentración-respuesta a NA.

2.5.- Experimentos encaminados a determinar la participación o no participación del receptor NMDA.

2.5.a.- Curvas en presencia de NMDA más glicina.

Finalidad.

Para determinar si la potenciación del efecto de la NA por el MK-801 era debido a un antagonismo sobre los receptores NMDA se probó el inhibirlo con un exceso de agonista, es decir, de NMDA y de glicina, aminoácido que modula positiva y alostéricamente este receptor.

Protocolo experimental.

Se añadió a la copa del baño una mezcla de NMDA y glicina (concentraciones finales en la copa, 300 μM y 10 μM respectivamente) 5 minutos antes de añadir el MK-801 (5,3 μM). En el minuto 10 se realizó la curva concentración-respuesta a NA y se compararon los resultados con los obtenidos sin la previa adición de los agonistas.

2.5.b.- Curvas en presencia de D-AP5.

Finalidad.

A fin de descartar que la potenciación del efecto de la NA por el MK-801 fuera debida a un antagonismo sobre el receptor NMDA se realizaron curvas concentración-respuesta a NA en presencia de un antagonista competitivo de estos receptores, como el D-AP5 (ácido D(-)-amino-5-fosfonopentanoico).

Protocolo experimental.

La concentración de D-AP5 utilizada ha sido de 10 μM , la cual se añadía a la copa del baño 10 min. antes de iniciar la curva concentración-respuesta a NA según el protocolo explicado anteriormente.

2.6.- Curvas concentración-respuesta a NA en órganos procedentes de ratas reserpinizadas.

2.6.a.- Finalidad.

La reserpina es un alcaloide que provoca una deplección intensa y prolongada de los depósitos de dopamina, noradrenalina y serotonina en las terminaciones nerviosas correspondientes al sistema nervioso periférico, central, médula suprarrenal y plaquetas. Esta deplección se debe a una interferencia con la membrana granular, a la que incapacita para incorporar y almacenar el contenido propio del gránulo. De este modo, las monoaminas son liberadas intracelularmente y son inactivadas por la monoamino oxidasa, quedando así depleccionadas sus reservas.

El pretratamiento de las ratas con reserpina se llevó a cabo para determinar si el efecto del MK-801 era debido a la estimulación de la liberación de noradrenalina.

2.6.b.- Administración de la reserpina.

Debido a los problemas de solubilidad que presenta este alcaloide se optó por administrarlo en forma de suspensión, por vía subcutánea. La suspensión se preparó en un vehículo de composición:

Carboximetilcelulosa sódica.....	0,5 %
Tween 80.....	0,1 %
Agua bidestilada.....	c.s.

Se pesaron 5 mg de reserpina y se pasaron a un mortero de vidrio, donde se homogeneizaron en un par de gotas del vehículo. Seguidamente, se fue añadiendo el resto de vehículo removiendo sin parar hasta un volumen final de 10 ml.

Dicha suspensión se administraba 16 horas antes del sacrificio de las ratas, a un volumen de administración de 10 ml/kg, con lo que la dosis administrada fue de 5 mg/kg.

2.6.c.- Protocolo experimental.

En este caso, las curvas concentración-respuesta a NA en presencia de MK-801 se realizaron antes que las curvas control para de evitar que se recargaran los depósitos de neurotransmisor, ya que se quería ver si la potenciación era debida a un estímulo de la liberación de la NA endógena.

El protocolo seguido fue:

- 1.- Despolarización con KCl 15 min. de recuperación.
- 2.- Curva concentración-respuesta a NA en presencia de MK-801 (5,3 μ M). 15 min. de estabilización.
- 3.- Realización de dos curvas concentración-respuesta control.

2.7.- Experimentos con baja concentración de sodio en el medio.

El sodio es un catión imprescindible para el funcionamiento de los transportadores de neurotransmisores. Para determinar si en el efecto del MK-801 estaba implicada la funcionalidad del transportador de NA se realizaron experimentos a una baja concentración de sodio en la solución salina.

Para reducir considerablemente la concentración de sodio en el medio se sustituyó el cloruro sódico de la solución de Krebs-Henseleit por una cantidad equimolar de cloruro de colina. Esta sal sustituye isoosmolarmente al cloruro sódico. La única cantidad de sodio remanente en el medio era la que provenía del NaHCO_3 (25 mM).

La reducción del sodio provocaba, en algún momento, la aparición de cierta actividad espontánea en el tejido, con lo que se impedía la correcta realización de curvas

concentración-respuesta acumulativas. Por ello se evaluó la potenciación por MK-801 del efecto de una concentración única de NA.

A fin de establecer comparaciones, un conducto deferente de cada animal fue colocado en solución de Krebs-Henseleit normal (control), mientras que el otro se colocó en el medio bajo en sodio. Las respuestas eran inducidas por la adición de una única concentración de NA (1,6 μM) en ausencia y en presencia de MK-801 (5,3 μM).

2.8.- Efecto sobre la tensión basal.

Al adicionar el MK-801 a la copa del baño se observaba un efecto sobre la tensión basal (actividad espontánea) en la muestra, con lo que se intentó determinar el efecto sobre ésta de los diferentes compuestos ensayados.

2.8.a.- Rata normal.

Estos experimentos se llevaron a cabo una vez realizadas las curvas concentración-respuesta en presencia de fármaco y de realizar una curva control de NA para ver si el efecto había desaparecido con los lavados.

15 minutos después de la última curva concentración-respuesta se procedió como se explica a continuación:

1.- Incubación del tejido con NA (16 μM) durante 3 min. Esta incubación se practicaba para recargar las reservas de NA a fin de evitar las diferencias entre los diferentes órganos. Pasados los 3 min. se realizaban 3 lavados para retirar la NA del medio.

2.- Se ponía en marcha el polígrafo para registrar la tensión basal durante 5 min.

3.- Adición del fármaco a la concentración más alta probada en las curvas concentración-respuesta. Registro durante 5 min. más.

2.8.b.- Inhibición de la actividad espontánea por prazosina y otros agentes farmacológicos.

Pasados 5 min. de registro de la actividad espontánea inducida por el MK-801 se añadió prazosina (antagonista α_1 postsináptico) a la concentración de 1 μM y se prosiguió con el registro a fin de observar su efecto.

De forma análoga, se probó el efecto de la yohimbina y de la combinación de NMDA + glicina sobre esta actividad espontánea a las mismas concentraciones descritas en los apartados 2.4.b y 2.5.a., respectivamente.

2.8.c.- Ratas reserpinizadas.

El protocolo seguido para determinar la actividad espontánea en órganos procedentes de ratas reserpinizadas fue el siguiente:

1.- Despolarización con KCl.

2.- Adición del MK-801 (5,3 μM) y registro de la tensión basal durante 10 min. 3 lavados seguidos.

3.- Incubación durante 3 min. con NA 16 μM . 3 lavados.

4.- Registro de la tensión basal durante 2 min., pasados los cuales se añadía el MK-801 (a igual concentración que en el punto 2) y se registró durante 10 min. más para detectar la posible aparición de la actividad espontánea.

2.9.- Análisis de los datos.

2.9.a.- Curvas concentración-respuesta a noradrenalina.

El valor de las concentraciones eficaces 50 (CE_{50}) para la noradrenalina fueron calculadas mediante el programa informático PROTO5, que utiliza rutinas de regresión lineal. Todos los resultados se expresan como la media \pm EEM (error estándar de la media) de n experimentos diferentes.

Un valor de P inferior a 0,05 se consideró significativo. Las diferencias entre los valores fueron determinadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de la t de Bonferroni, utilizando el programa informático GraphPAD InStat (GraphPAD Software, San Diego, LA, USA).

2.9.b.- Obtención de la CE_{100}

A fin de obtener un valor numérico que permitiera comparar las potencias de los fármacos empleados en lo que respecta a la potenciación de las respuestas inducidas por NA exógena se procedió a calcular, para cada una de las curvas concentración-respuesta en presencia de diferentes concentraciones de fármaco, el porcentaje de potenciación a una determinada concentración de NA respecto a las curvas control. La concentración de NA escogida fue 0,2 μ M, ya que era a concentraciones bajas cuando se observaba mayor potenciación, al estar todavía lejos del efecto máximo.

En lo que respecta a las respuestas inducidas por estimulación eléctrica, se tomó el porcentaje de potenciación de las mismas a cada una de las concentraciones de fármaco ensayadas.

A partir de los valores así calculados se elaboraron las curvas concentración de fármaco (log) - efecto (% de potenciación) y de ellas, por regresión lineal, se obtuvo la CE_{100} , que es la concentración de fármaco necesaria para inducir un 100 % de potenciación de la respuesta.

2.9.c.- Cálculo de la K_i .

La posible inhibición de la recaptación de NA en los experimentos en baño de órganos con MK-801 fue cuantificada siguiendo los cálculos propuestos por Kenakin (1987). Brevemente, asumiendo que el proceso de recaptación sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten, y que la relación $[A]/[A']$ se refiere a las concentraciones eficaces de noradrenalina en el baño de órganos en ausencia ($[A]$) y en presencia ($[A']$) del inhibidor de la recaptación.

De ello se deriva la K_i , definida como la constante de disociación en el equilibrio del complejo inhibidor-transportador, que puede ser calculada según la siguiente ecuación:

$$\log \left[\frac{y(x-1)}{y-x} \right] = \log [I] - \log K_i$$

Donde $[I]$ es la concentración de inhibidor, x representa la sensibilización del tejido al agonista en presencia del inhibidor (por ejemplo, la potenciación de la respuesta al agonista ($[A/A']$) producida por $[I]$) e y que representa la máxima potenciación obtenida (por ejemplo, la relación $[A]/[A']$ a la máxima $[I]$).

3.- ENSAYOS DE UNIÓN CON [³H]NISOXETINA.

3.1.- Preparación de las membranas.

A los órganos limpios, pesados y troceados se les añadió tampón Tris-sacarosa, pH 7,4 (apartado 3.3.b de esta sección), en proporción 1:20 y se procedió a su homogeneización en un Polytron (Kinematica) dos veces durante 30 segundos a velocidad máxima.

El homogeneizado se filtró a través de tres capas de gasa quirúrgica, se distribuyó en tubos de centrífuga y se centrifugó a 700 X g (3.000 rpm, centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-21) durante 10 min. El sobrenadante así obtenido se centrifugó a 17.200 X g (14.500 rpm, centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-21) durante 10 min. más.

A continuación, el sobrenadante obtenido se trasvasó a tubos de ultracentrífuga y se centrifugó a 100.000 X g (40.000 rpm, ultracentrífuga Beckman L8-55M, rotor TY-65) durante 45 min. El *pellet* resultante se resuspendió en 400 µl de tampón Tris-HCl sin sacarosa, pH 7,4 y se procedió a la determinación proteica del mismo antes de conservarlo a -80 °C hasta su utilización. Durante todo el proceso de obtención se mantuvo una temperatura de 4 °C a fin de evitar que se degradara la preparación.

3.2.- Determinación proteica. Método de Bradford.

Ya que la unión de un radioligando a un receptor depende de la concentración proteica en el medio de incubación, es necesario determinarla y ajustarla a la concentración deseada. El método de Bradford (1976) presenta las ventajas de ser rápido y muy sensible, ya que permite la detección de cantidades de proteína del orden de microgramos por microlitro. Se fundamenta en una reacción colorimétrica con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250, que se une a la proteína al cabo de dos minutos. El complejo formado por el colorante y la proteína provoca un cambio del máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm, a la cual se mide la absorbancia.

Frente al método de Lowry presenta la ventaja de que no se producen interferencias debidas a iones como el K^+ o el Mg^{2+} , EDTA y glúcidos; aunque se pueden producir interferencias de alteración del color en presencia de algunos detergentes como el Triton X-100 y el SDS entre otros, requiriéndose en este caso realizar controles.

3.2.a.- Preparación del colorante.

Se pesan 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 y se disuelven en 50 ml de etanol. Se añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85 % p/v y se enrasa hasta 1 litro con agua destilada.

3.2.b.- Descripción del ensayo.

Para la determinación proteica es necesario elaborar primero una recta patrón de albúmina sérica bovina (ASB). Se parte de una disolución de ASB al 0,025 % p/v, de la que se toman mediante una micropipeta los volúmenes necesarios que contengan 2, 4, 6, 8 y 10 μ g de proteína. Se depositan en tubos de ensayo, se completa el volumen hasta 50 μ l con tampón y se añade a cada tubo 1 ml de solución colorante.

A partir de la suspensión proteica problema se realizó una dilución 1:10 (10 µl/90 µl). De esta dilución se preparaban tres tubos que contenían 10 µl de la misma y 40 µl de tampón , añadiéndose a continuación 1 ml de colorante.

Al cabo de 15 min. desde la adición del colorante se medía la absorbancia a 595 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1203.

Los valores de absorbancia presentados por la muestra problema (la media de los tres tubos) se interpolan en la recta de regresión definida por la recta patrón y, considerando la dilución efectuada a la muestra, se obtiene la concentración proteica de la suspensión problema.

3.3.- Tampones y soluciones.

Para los ensayos de unión es necesario trabajar a un pH dentro del intervalo fisiológico (entre 7 y 8). El agente tamponante más empleado en este tipo de ensayos es el *Trizma®-HCl* (hidrocloruro de tris(hidroximetil)-aminometano) y que se abrevia como Tris-HCl.

3.3.a.- Tampón Tris-HCl 50 mM , pH 7,4.

Se utiliza para la resuspensión de las membranas, para la incubación del radioligando con la proteína y para preparar las diluciones de los fármacos desplazantes. Su composición es la siguiente:

	Concentración	Gramos/litro
Tris HCl	50 mM	7,88
KCl	5 mM	0,37
NaCl	300 mM	17,53
NaOH	c.s.p. pH 7,4	-
Agua destilada	c.s	c.s.p. 1 l

3.3.b.- Tampón Tris-HCl 50 mM (sacarosa 250 mM), pH 7,4.

Se utiliza para la homogeneización y preparación de las membranas. Su composición es la misma que el tampón anterior pero añadiéndole 250 mM de sacarosa y ajustando el pH a 7,4. Para preparar 100 ml se requiere añadir 8,56 g de sacarosa a 100 ml de tampón y ajustar el pH hasta 7,4.

3.3.c.- Solución de polietilenimina al 0,5 % (v/v).

Se utiliza para pretratar los filtros de fibra de vidrio que se utilizan para separar el radioligando unido del libre con el fin de minimizar la unión inespecífica de radioligando a los mismos. Se compone de:

- Polietilenimina al 50 %..... 1ml
- Agua destilada.....c.s.p. 100 ml

3.4.- Condiciones para determinar la unión de un ligando a un receptor.

3.4.a.- Generalidades.

Una forma de determinar la unión de una sustancia a un receptor es empleando esta sustancia marcada radiactivamente (generalmente tritiada) y que se denomina **radioligando**, incubarla junto a la proteína que contiene dicho receptor y medir la radiactividad unida a la misma mediante sistemas de contaje. Por otra parte, para caracterizar un receptor es necesario, además de utilizar un ligando de alta especificidad para el mismo, mantener unas condiciones determinadas de temperatura, pH, concentración proteica y tiempo de incubación con el fin de obtener el máximo de unión específica.

La **unión específica** es aquella que se establece entre el ligando y el receptor objeto de estudio. Dicha unión es imposible de determinar directamente ya que el ligando tiende también a unirse inespecíficamente a otros sitios, es decir, que paralelamente se produce una **unión inespecífica**. La unión inespecífica se puede deber a la liposolubilidad del ligando, por la cual se une a, por ejemplo, lípidos de membrana; a la atracción de cargas entre el ligando y otros lugares distintos del receptor; y a fenómenos de adsorción en la proteína o en el filtro empleado para separar el radioligando unido del libre entre otras causas. Una característica fundamental de la unión inespecífica es que ésta se incrementa linealmente conforme se incrementa la concentración de radioligando, ya que no llega a saturarse. La **unión total** es, pues, la suma de la unión específica más la inespecífica, con lo que la unión específica se obtendrá restando la unión inespecífica de la total:

$$\text{UNIÓN ESPECÍFICA} = \text{UNIÓN TOTAL} - \text{UNION INESPECÍFICA}$$

Para determinar la unión inespecífica se incubaba el radioligando con la proteína y, además, con un exceso de ligando frío (sin marcar) que puede ser el mismo que el radioligando u otra sustancia que presente afinidad por el mismo receptor. La concentración de fármaco frío empleada suele ser 100 veces mayor que el valor de la K_D del radioligando. Al lograrse así una concentración saturante de ligando frío y, al ser la unión de un ligando a su receptor un proceso dinámico, ambos ligandos (marcado y frío) competirán por la misma población de receptores y ésta se saturará de ligando frío. De este modo el radioligando sólo se unirá de forma significativa a lugares inespecíficos.

Para caracterizar completamente un receptor es necesario realizar cuatro tipos de ensayos: ensayos de saturación, ensayos cinéticos de asociación, ensayos cinéticos de disociación y estudios de competición. Los ensayos de saturación permiten determinar la densidad de receptores en un tejido, (la B_{max}); y la afinidad del ligando por el receptor, que se expresa mediante la K_D y que se define como la concentración de ligando necesaria para ocupar el 50 % de la B_{max} . Los ensayos cinéticos de asociación permiten determinar el tiempo necesario para que el radioligando se una al receptor y se alcance el equilibrio termodinámico, así como la constante observada de asociación K_{obs} . Los ensayos cinéticos de disociación proporcionan el valor de la constante de disociación

K_{+1} . A partir de la K_{obs} y de la K_{-1} se puede calcular la constante de asociación K_{+1} mediante la ecuación:

$$K_{+1} = \frac{K_{obs} - K_{-1}}{F}$$

Donde F representa la concentración inicial de radioligando.

Haciendo el cociente entre la constante de disociación y la de asociación se obtiene la K_D , que tiene que ser del mismo orden que la hallada en los estudios de saturación.

Finalmente, los ensayos de competición permiten establecer la especificidad de la preparación al estudiar la afinidad que otros fármacos puedan tener por el receptor al desplazar a determinadas concentraciones el radioligando. El procesamiento de los datos obtenidos en estos ensayos permite obtener la CI_{50} (concentración inhibitoria 50 %), que es la concentración de sustancia que desplaza el 50 % del radioligando unido específicamente al receptor. De estos ensayos también se obtiene la K_I , que es una medida de la afinidad de la sustancia desplazante por el receptor.

3.4.b.- Condiciones del ensayo.

Tiempo de incubación.

En los ensayos de saturación y competición el tiempo de incubación del radioligando con la proteína ha de ser el suficiente para que se alcance el equilibrio entre el radioligando y el receptor. Cabe destacar que el tiempo que se tarda en alcanzar el equilibrio depende de la concentración de radioligando, por lo cual se suelen usar concentraciones bajas del mismo para determinar dicho tiempo.



Para determinar el tiempo de incubación será necesario realizar un estudio de unión a diferentes tiempos de incubación y ver a partir de cual se alcanza la saturación.

Temperatura.

La unión del radioligando a su receptor varía en función de la temperatura. Por ello es necesario realizar ensayos de unión a diferentes temperaturas y ver a cuál se produce la máxima unión específica. Mientras que algunos ligandos requieren temperaturas fisiológicas, otros presentan mayor unión específica a temperaturas entre 0 y 4 °C. La causa por la cual se podría explicar una mayor unión a baja temperatura podría ser una menor degradación del radioligando, una disminución de la unión inespecífica y el hecho de que algunos radioligandos tienen una mayor afinidad en estas condiciones.

Regulación del pH.

Generalmente, el pH suele mantenerse dentro del rango fisiológico, entre 7 y 8. El agente tamponante más utilizado es el Tris(hidroximetil)-aminometano, pero no es necesariamente el mejor y, por lo tanto, para poner a punto un método hará falta determinar cuál es el tampón más adecuado para el ensayo.

Presencia de iones y GTP.

Cationes como el Na^+ y el Mg^{2+} , entre otros, se añaden algunas veces al tampón de incubación ya que pueden hacer aumentar o disminuir la unión específica del radioligando. Del mismo modo, algunos nucleótidos como el GTP se añaden al tampón de incubación a concentraciones del orden de 100 mM, al poder afectar el comportamiento del receptor que se estudia.

3.4.c.- Separación del radioligando unido del libre.

Una vez se ha incubado el radioligando con el receptor el tiempo necesario para que se alcance el equilibrio, hace falta separar el radioligando unido al receptor del que ha quedado libre para poder cuantificarlo posteriormente. Este proceso es muy delicado ya que ha de ser lo más rápido posible para evitar que se altere el equilibrio y poder así obtener resultados repetitivos. La separación puede llevarse a cabo por tres técnicas:

- Por diálisis.
- Por centrifugación.
- Por filtración.

Los tres métodos son válidos, pero cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes, de manera que la elección de uno de ellos dependerá de las características del ensayo a realizar.

Separación por diálisis.

Es teóricamente la más idónea ya que el equilibrio no se altera. Consiste en dos celdas de diálisis separadas en dos cámaras de volumen conocido por una membrana de diálisis que el radioligando puede atravesar, pero no la proteína. En una de las cámaras se coloca la muestra a estudiar y en otra la disolución del radioligando. El radioligando tiene tendencia a igualar las concentraciones a ambos lados de la membrana, por lo que la atravesará y se unirá a la proteína. Al llegar al equilibrio tendremos en una celda el radioligando unido a proteína más radioligando libre, mientras que en la otra tendremos radioligando libre. Como la concentración de radioligando libre será la misma en ambas celdas, la cantidad unida se obtiene por diferencia de la radiactividad de ambas celdas. La gran desventaja de este método es su inoperatividad, ya que no permite procesar gran cantidad de muestras a la vez y, por tanto suele reservarse a casos en que el radioligando presenta una baja afinidad por el receptor.

Separación por centrifugación.

En ésta se procede a la centrifugación de la muestra una vez se ha alcanzado el equilibrio. El pellet obtenido corresponde a la proteína más el radioligando unido, mientras que el sobrenadante contiene el radioligando libre. Un inconveniente que presenta es que el radioligando libre puede quedar retenido en el pellet originando un error, por lo cual, para tratar de corregirlo, se usan medios de gran densidad como gradientes de sacarosa. Esta técnica se utiliza cuando la unión inespecífica es demasiado alta en los filtros o cuando la velocidad de disociación del complejo radioligando-receptor es elevada.

Separación por filtración.

Es la técnica más utilizada en los ensayos de unión de un radioligando a un receptor. Para evitar la disociación del radioligando unido del receptor hace falta que la filtración sea lo más rápida posible. Para conseguirlo, la filtración se hace por vacío a través de filtros de fibra de vidrio, donde quedará retenida la proteína con el radioligando unido al receptor, y el radioligando libre quedará en el líquido filtrado. Un inconveniente es la unión inespecífica de radioligando al filtro, fenómeno que se solventa lavando con tampón el filtro varias veces, una vez se ha filtrado, y tratando los filtros con una solución de polietilenimina al 0,5 % antes de usarlos para evitar la unión debida a las cargas eléctricas. Para tratar los filtros también puede usarse albúmina o gelatina.

Sus ventajas son la rapidez y posibilidad de procesar un número elevado de muestras a la vez. Ha sido el método utilizado en el presente trabajo. Sus inconvenientes son la unión inespecífica al filtro, que puede ser grande en algunos sistemas, y que no se puede utilizar cuando la disociación es rápida o el radioligando presenta una baja afinidad por el receptor.

3.4.d.- Técnica del centelleo líquido.

Una vez se tiene el complejo radioligando-receptor retenido en el filtro es necesario detectar y cuantificar la radiación que contiene para transformarla posteriormente a cantidad de radioligando unido. Para ello se depositan los filtros en viales de centelleo y se les añade 10 ml de líquido o cóctel de centelleo. La técnica del centelleo líquido se fundamenta en la conversión de la energía de las radiaciones emitidas por el radioligando en fotones gracias a su interacción con los compuestos orgánicos que contiene el líquido de centelleo. En el presente trabajo los radioligandos están marcados con tritio, que emite radiación β que, al interaccionar con el líquido de centelleo, será convertida en energía electromagnética (proceso de centelleo) y posteriormente cuantificada instrumentalmente (proceso de detección y cuantificación).

Proceso de centelleo.

Esta etapa tiene lugar dentro del vial que contiene el radioligando y el líquido de centelleo. El líquido o cóctel de centelleo se compone de disolventes y del líquido de centelleo propiamente dicho. Los disolventes contienen grupos aromáticos que captan la energía de las radiaciones, teniendo lugar ionizaciones y excitación de moléculas. La energía generada es transferida a las moléculas del líquido de centelleo, que resultan a su vez excitadas y retornan a su estado inicial emitiendo la energía en forma de fotones.

La finalidad de este proceso es amplificar la cantidad de fotones que se emite y disminuir su energía, para que se ajuste a las características del aparato contador y a las más óptimas para cada radioisótopo.

Proceso de detección y cuantificación.

En este proceso se transforman los fotones emitidos en el centelleo en impulsos eléctricos que sean detectados por el contador. Los fotones originados son captados por un fotomultiplicador que, bajo su acción, desprende electrones, consiguiendo de esta manera amplificar la señal para su posterior tratamiento electrónico. Como la cantidad de fotones emitida es directamente proporcional a la actividad existente en el vial, para un isótopo dado, a mayor intensidad de los impulsos registrados, mayor será la cantidad de radioligando presente en el vial.

Un parámetro a tener en cuenta es la **eficiencia de contaje (E)**, que es la relación entre las cuentas detectadas por el contador de centelleo, normalmente expresadas como cuentas por minuto (cpm), y la actividad real de la muestra expresada como desintegraciones por minuto (dpm):

$$E = \text{cpm} / \text{dpm}$$

En una situación ideal, la eficiencia debería de ser igual a 1 (se detectaría toda la energía radiactiva); pero en muchos casos no es así debido a que existen una serie de

procesos que absorben energía radiactiva para, por ejemplo, producir reacciones químicas. Para conocer el valor real de las desintegraciones (dpm) es necesario pues conocer la eficiencia de contaje del proceso.

Al conjunto de fenómenos que impiden alcanzar el valor ideal de eficiencia se les denomina "quenching". Los tipos de quenching más frecuentes son el quenching por el color (si la muestra con el cóctel origina o tiene color, éste absorbe fotones) y el quenching químico (la energía se emplea para llevar a cabo reacciones químicas). Por ello es imprescindible realizar una curva de calibración de eficiencia de contaje con el líquido de centelleo que se utilice y patrones de actividad conocida para así conocer la eficiencia real y calibrar el aparato con los valores obtenidos.

3.5.- Descripción de los ensayos de unión.

3.5.a.- Incubación.

La incubación es la etapa donde el radioligando interacciona durante un tiempo determinado con el receptor. En nuestros experimentos se mantuvo una temperatura entre 0 y 4 °C. El radioligando empleado ha sido la [N-metil-³H]nisoxetina·HCl (New England Nuclear), de actividad específica 80,6 Ci/mmol, en solución etanólica, conservado a -30 °C en su disolvente de origen.

Cabe destacar que las disoluciones de radioligando se degradan con rapidez al almacenarlas, incluso en frío y durante cortos períodos de tiempo, debido al intercambio del tritio con los protones del agua y por fenómenos de autoradiólisis (aceleración de las reacciones de degradación de la molécula que incorpora el radionúclido debido a la energía que se desprende en las desintegraciones). Por otra parte, es necesario efectuar las diluciones del radioligando en tubos de vidrio, ya que el plástico se ha visto que puede absorber la radiactividad. Por todo ello, todas las diluciones de radioligando se han realizado en tubos de vidrio de borosilicato, en el momento justo de realizar el experimento y en la cantidad justa

que se iba a emplear en el mismo, a partir de la solución etanólica proporcionada por el proveedor, y empleándose de forma extemporánea.

En nuestros experimentos, la incubación se ha llevado a cabo a una temperatura entre 0 y 4 °C (introduciendo los tubos en hielo picado). El tiempo de incubación, obtenido a partir de los resultados de los ensayos cinéticos de asociación (ver resultados), ha sido de 3 horas. Las concentraciones proteicas han sido siempre las mismas para un ensayo determinado, siendo de 50 o 100 µg de proteína en un volumen de incubación final de 250 µl.

Una vez preparados los tubos y las diluciones de fármacos competidores, la incubación se inicia al poner en contacto 125 µl de la suspensión proteica (diluida de tal manera que en el volumen final se alcance la concentración deseada), con 125 µl de dilución del radioligando (2 nM), resultando una concentración final de 1 nM (ensayos cinéticos y de competición).

Seguidamente, los tubos se introducen en hielo picado y se mantienen en el mismo durante tres horas, pasadas las cuales se procede a la separación del radioligando unido del libre.

3.5.b.- Separación del radioligando unido del libre y contaje.

El método de separación escogido para la separación del radioligando unido del libre ha sido la filtración. Pasado el tiempo de incubación, se para la reacción añadiendo al tubo 4 ml de tampón Tris-HCl 50 mM frío e inmediatamente se filtra el contenido a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) colocados en un aparato de filtración múltiple (Millipore) conectado a una bomba de vacío. El tubo y los filtros se lavan dos veces añadiendo 4 ml más de tampón cada vez. Los filtros habían sido pretratados con una solución de polietilimina al 0,5 % (apartado 3.3.c de esta sección) durante un mínimo de 15 min. a fin de reducir la unión inespecífica de radioligando a los mismos.

Una vez realizada la filtración, los filtros se colocaban en viales de plástico y se añadía a cada uno de ellos 10 ml de cóctel de centelleo (Biogreen 1). Pasada 1 hora, se procedía al conteo de la radiactividad mediante un contador de centelleo (Beckman LS-1800).

3.5.c.- Tratamiento de los resultados.

Los datos obtenidos de la detección de la radiactividad presente en los viales, expresados en dpm en función de la eficiencia, se procesan en un ordenador que ejecuta un software capaz de calcular las constantes a partir de los mismos y de representar gráficamente los resultados. El paquete de programas utilizado ha sido el KINETIC, EBDA, LIGAND (McPherson y col. 1980).

3.5.d.- Ensayos realizados.

Ensayos de saturación.

En este tipo de ensayos se mide el incremento de la unión específica al aumentar la concentración de radioligando, manteniéndose constante el tiempo de incubación y la concentración proteica. La cantidad de complejo radioligando-receptor se calcula en función de la concentración de radioligando libre. Estos experimentos proporcionan dos constantes de gran importancia en la caracterización de un receptor, la K_D (que mide la afinidad del radioligando por el receptor) y la B_{max} (que proporciona la densidad de receptores del tejido).

La expresión matemática que relaciona la concentración del complejo radioligando-receptor y el radioligando libre es:

$$B = \frac{B_{max} \cdot F}{K_D + F}$$

donde B es la cantidad de radioligando unido, B_{max} la máxima cantidad de radioligando unida al receptor (es decir, el número máximo de receptores), y F es la cantidad de radioligando libre. Esta ecuación genera un hipérbola rectangular, como se observa en la figura 7. Cuando la concentración de radioligando libre es igual a la K_D , la cantidad de radioligando unida al

receptor corresponde a la mitad de la B_{max} . Así pues, la K_D es la concentración de radioligando que ocupa la mitad de la B_{max} . A menor valor de la K_D , mayor afinidad del radioligando por el receptor.

El procedimiento a seguir para realizar estos ensayos es preparar diluciones del radioligando a concentraciones crecientes para conseguir llegar a ocupar todos los receptores presentes en el tejido de estudio, manteniéndose constante la concentración proteica y el tiempo de incubación. De cada concentración de radioligando se efectuarán controles para saber la cantidad de radiactividad total añadida a cada tubo, así como la unión inespecífica en presencia de ligando frío (en nuestro caso, desipramina) a una concentración de 10 μ M. La evolución de la unión total a inespecífica a diferentes concentraciones de radioligando se muestra en la siguiente figura:

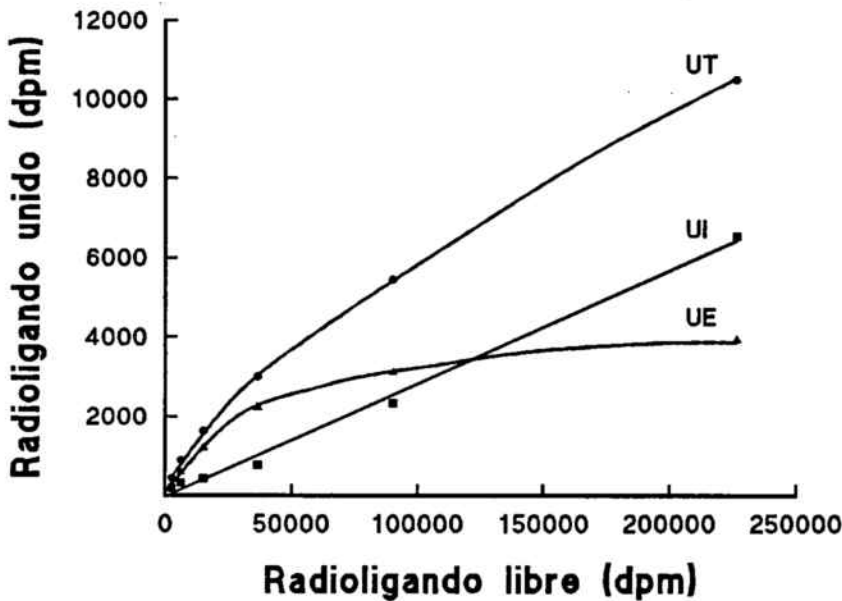


Figura 7.- Evolución de la unión de un radioligando a diferentes concentraciones. UT: unión total. UI: unión inespecífica. UE: unión específica.

El programa informático de tratamiento de los datos (EBDA) se encarga de hacer las pertinentes transformaciones a partir de los datos experimentales.

La representación de Scatchard permite determinar la B_{max} aunque no se haya conseguido saturar los receptores. Se deduce tal como se explica a continuación:

Volviendo a la ecuación $B = \frac{B_{max} \cdot F}{K_D + F}$, es lo mismo que $(B \cdot K_D) + (B \cdot F) = B_{max} \cdot F$;

dividiendo ambos términos por F obtenemos $\frac{B \cdot K_D}{F} + B = B_{max}$, y, aislando B/F resulta

$\frac{B}{F} = \frac{B_{max}}{K_D} - \frac{B}{K_D}$, que es una expresión que corresponde a la ecuación de una recta ya que se

puede reorganizar como $\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} B + \frac{B_{max}}{K_D}$.

Así pues, en la representación de Scatchard (fig.8) se representa en abscisas la concentración de radioligando unido (B) frente al cociente de radioligando unido dividido por el libre (B/F). De este modo se obtiene, si el radioligando interacciona con una única población de receptores, una recta cuya intersección con el eje de abscisas corresponde al valor de la B_{max} y cuya pendiente es $-1/K_D$. Si existe más de una población de receptores y las K_D para cada una de ellas es diferente, se obtiene una curva que puede descomponerse en dos rectas, la pendiente de cada una de las cuales proporcionará el valor de la K_D para cada población.

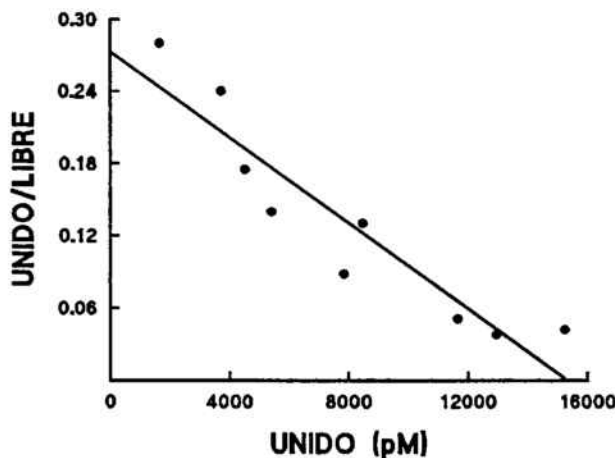


Figura 8.- Representación de Scatchard. La pendiente de la recta es $-1/K_D$, mientras que su intersección con el eje de abscisas proporciona el valor de la B_{max} .

Otra de las transformaciones que se realizan a partir de los ensayos de saturación es la representación de Hill, la cual permite determinar si la interacción que se estudia es o no bimolecular. La ecuación de Hill es la siguiente:

$$\frac{B}{B_{max}} = \frac{[F]^n}{K_D + [F]^n}$$

Cuando $n = 1$, la interacción obedece la ley de acción de masas para reacciones bimoleculares. En esta ecuación, n representa el número de lugares de unión por molécula de receptor. Para facilitar su representación, la anterior expresión matemática puede transformarse reagrupando términos y aplicando logaritmos:

$$\begin{aligned} (B \cdot K_D') + (B \cdot [F]^n) &= B_{max} \cdot [F]^n; \\ B \cdot K_D' &= (B_{max} - B) \cdot [F]^n; \\ \frac{B}{B_{max} - B} K_D' &= [F]^n; \\ \frac{B}{B_{max} - B} &= \frac{[F]^n}{K_D'}; \\ \log \frac{B}{B_{max} - B} &= (n \cdot \log[F]) - \log K_D' \end{aligned}$$

La representación de Hill representa el $\log (B/B_{max}-B)$ frente al $\log [F]$ (fig.9). La pendiente de la recta resultante, n , se denomina coeficiente de Hill (n_H). Si el valor de dicho coeficiente no difiere de la unidad, K_D' es igual a K_D . En este caso, la población de receptores ocupada por el radioligando será de un solo tipo, la interacción fármaco-receptor será bimolecular y cumplirá la ley de acción de masas. En el caso de que hubiera más de un tipo de población de receptores ocupada, el coeficiente de Hill sólo podría ser 1 si las afinidades del radioligando por los subtipos de receptor fueran iguales y los diferentes lugares de unión no interaccionaran entre sí.

Si n_H es mayor que 1, existe cooperatividad negativa en la interacción fármaco-receptor. Si es menor que 1, hay diversas posibles interpretaciones: existe cooperatividad negativa, o hay diferentes poblaciones de receptores que no interaccionan entre sí o bien hay múltiples estados interconvertibles en los que la afinidad no varía.

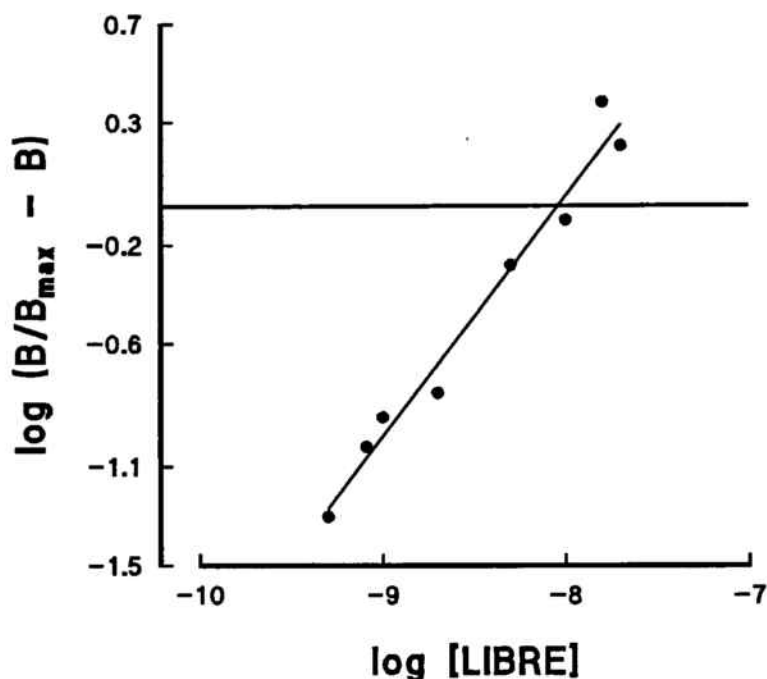


Figura 9.- Ejemplo de representación de Hill. La pendiente de la recta corresponde al coeficiente de Hill (n_H).

Ensayos cinéticos.

En estos ensayos se determina la variación de la unión de un radioligando en función del tiempo. Podemos distinguir 2 tipos: ensayos cinéticos de asociación y cinéticos de disociación.

La finalidad de los ensayos de asociación es determinar el tiempo que se tarda en saturar el número máximo de receptores a una concentración de radioligando determinada. De este modo se obtiene el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre radioligando y receptor a esta concentración de radioligando, que será de utilidad en los ensayos de saturación y competición. Además, de estos estudios se obtiene la constante observada de asociación (K_{obs}) y de los de disociación la constante de disociación (K_{-1}). A partir de estos dos valores, se puede obtener la constante de asociación (K_{+1}) aplicando la ecuación descrita en el apartado 3.4.a. Si tenemos en cuenta que:

$$K_D = \frac{K_{-1}}{K_{+1}}$$

los estudios cinéticos nos permiten obtener una aproximación de la K_D que, óptimamente, ha de ser del mismo orden que la obtenida mediante los estudios de saturación.

La metodología a seguir en los ensayos de asociación consiste en preparar tubos con la misma concentración de radioligando y proteína, pero variando el tiempo de incubación de los mismos. En nuestro caso, hemos escogido un intervalo de tiempo que comprende desde 5 minutos hasta cuatro horas (5', 15', 30', 60', 120', 180', 210' y 240'), procediéndose a la filtración de los tubos una vez se cumple el tiempo de incubación que tiene fijado cada uno. De cada tiempo se calcula la correspondiente unión total y unión inespecífica, esta última en presencia de una concentración de ligando frío de 10 μM .

Una vez realizado el ensayo de asociación, se determina la unión específica (UT-UI) para cada tiempo y se representa la curva de asociación que, si se linealiza con el método de pseudo primer orden o se trata con un software de regresión no lineal nos dará el valor de K_{obs} . De manera alternativa, puede calcularse el logaritmo neperiano de la cantidad de radioligando unido en el equilibrio (B_e) dividida por la diferencia entre B_e y la cantidad de radioligando unido en el tiempo t (B) y representarlo respecto al tiempo según la ecuación:

$$\ln B_e / B_e - B = (K_{+1}F + K_{-1}) t + K_{obs}t$$

y con ello se obtiene una recta cuya pendiente nos da el valor de K_{obs} , tal como muestra el siguiente ejemplo (página siguiente):

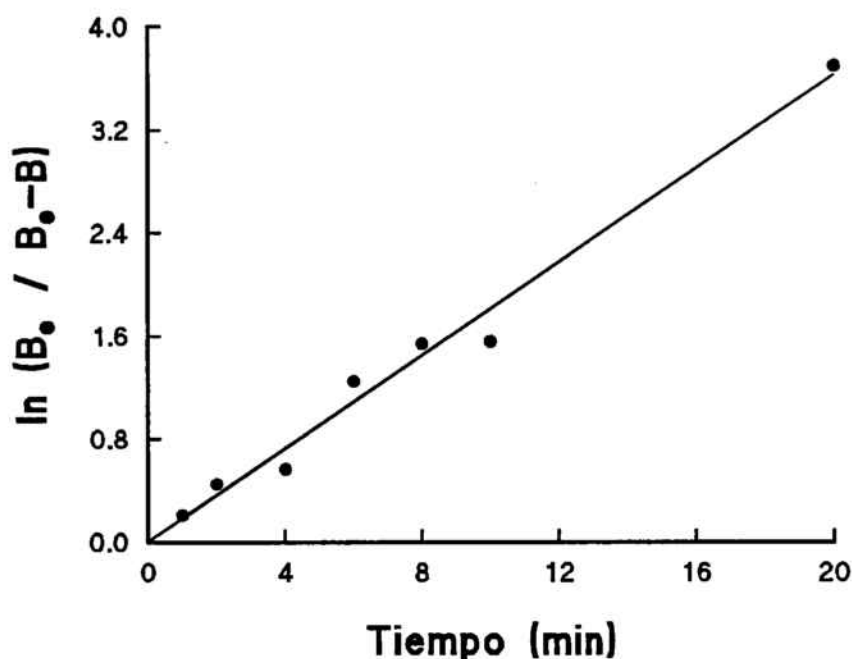


Figura 10.- Representación del $\ln (B_e / B_e - B)$ respecto al tiempo de incubación. El valor de la pendiente de la recta es la K_{obs} .

Los ensayos cinéticos de disociación proporcionan el valor de K_{-1} . Para realizar el ensayo se incuban los tubos con la proteína y el radioligando el tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio (3 horas en nuestro caso) y, pasado este tiempo, se añade una cantidad de ligando frío (desipramina) tal que su concentración final sea de 100 μM para que empiece a disociarse el radioligando unido del receptor. La representación de la unión específica en función del tiempo transcurrido desde la adición del ligando frío es la curva de disociación.

A partir de la curva de disociación y con un programa de regresión no lineal puede obtenerse la K_{-1} . Otra manera de obtener esta constante es representar el logaritmo neperiano del cociente entre la unión específica a un tiempo determinado (B) y la resultante en el tiempo 0 de adición del ligando frío (B_0) respecto al tiempo, siendo el valor de la pendiente de la recta de regresión resultante $-K_{-1}$, tal como muestra la siguiente gráfica:

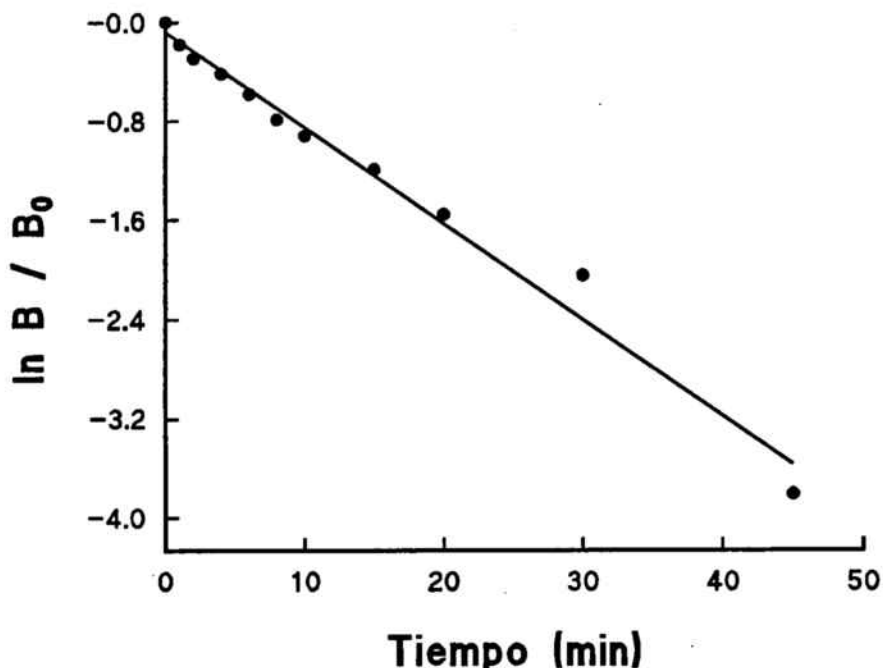


Figura 11.- Representación del ln (B / B₀) respecto al tiempo de disociación.

A partir del valor de K₁ se puede obtener el valor de la vida media de disociación:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_{-1}}$$

Ensayos de competición.

En estos ensayos se mide la afinidad que tiene un determinado compuesto, no marcado radiactivamente, para el receptor que se estudia en función de su capacidad para competir con el radioligando por el mismo receptor. Los parámetros que se mantienen constantes son las concentraciones de radioligando y de proteína, que se ponen en contacto con diferentes concentraciones de la sustancia competidora. El tiempo de incubación para estos ensayos ha sido de 3 horas, transcurridas las cuales se procedió al filtrado del contenido de los tubos tal como se ha explicado anteriormente. A medida que la concentración de competidor es mayor, cabe esperar una menor cantidad de radioligando unido al receptor.

Estos estudios sirven también para demostrar una especificidad farmacológica, es decir, el radioligando que se estudia debe ser desplazado o, mejor dicho, competir con todos los fármacos de su mismo grupo farmacológico.

Si se representa la unión específica frente al logaritmo de la concentración de competidor o desplazante se obtiene una curva sigmoidea (fig. 12) en el caso de que exista un único lugar de unión. La ecuación que relaciona la concentración de radioligando unido (B) con la concentración de desplazante (I) es la siguiente

$$B = \frac{B_{max} \cdot F}{F + K_D \left(\frac{1+I}{K_i} \right)}$$

siendo K_i la afinidad del competidor por el receptor. La concentración de desplazante a la cual la unión del radioligando es la mitad de la total (sin desplazante) se denomina CI_{50} , o concentración inhibitoria 50 %.

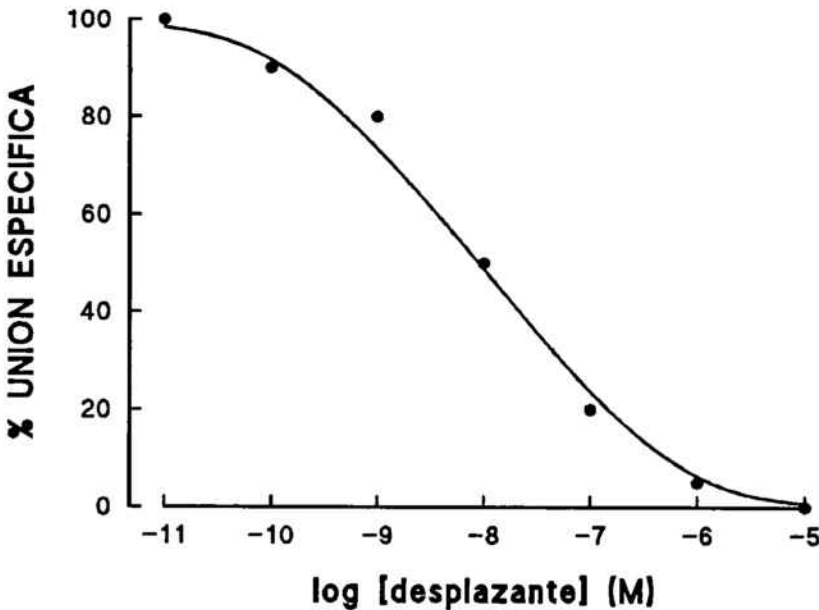


Figura 12.- Representación ejemplo de la disminución de la unión específica respecto a la concentración de fármaco desplazante.

4.- ENSAYOS DE CAPTACIÓN DE [³H]NORADRENALINA

4.1.- Tampones utilizados.

Para estos ensayos se ha utilizado la solución salina de Krebs-Henseleit, de composición igual a la descrita en el apartado 2.2 de esta sección, pero añadiéndosele un 0,1 % de ácido ascórbico para evitar la oxidación de la noradrenalina.

4.2.- Descripción de los experimentos.

Se ha cuantificado el transporte de noradrenalina a través de la membrana citoplasmática en función de la cantidad de noradrenalina tritiada que se incorpora del medio de incubación al conducto deferente, en ausencia o en presencia de los ligandos σ y PCP. El proceso de captación suele denominarse bajo el término inglés *uptake*.

La obtención de los conductos deferentes se realizó según se describe en el apartado 1. Una vez extraídos y limpios, se biseccionaron en parte epididimal y parte prostática. En estos experimentos se ha utilizado la parte epididimal, ya que en ella predomina la neurotransmisión adrenérgica, mientras que alguna de las partes prostáticas se utilizó para realizar controles de eficiencia del contaje.

Las partes epididimales fueron a continuación suavemente secadas con papel absorbente y pesadas, recortándose, si fuera necesario, para que estuvieran comprendidas en un peso entre 10 y 20 mg. Una vez anotado el peso, se introdujo cada una en un vial de vidrio que contenía 10 ml de solución de Krebs-Henseleit previamente oxigenada con gas carbógeno, introdujéndose seguidamente en un baño María a 37 °C, donde se dejaron preincubar y estabilizar durante 30 min., con aireación continuada de carbógeno.

El proceso de *uptake* se iniciaba, después de la preincubación, con la transferencia de los tejidos a tubos de plástico que contenían 0,95 ml de solución de Krebs-Henseleit sin (controles) o con el fármaco inhibidor a la concentración deseada, previamente atemperada y oxigenada. Pasados 10 min., se añadió a cada tubo 50 µl de una dilución de levo [³H]noradrenalina (New England Nuclear, actividad específica 10,3 Ci/mmol) preparada para alcanzar una concentración final de 0,1 µM y se dejó incubar 3 min. a 37 °C. Este tiempo fue el escogido ya que corresponde al tramo lineal en la cinética de incorporación y coincide con el utilizado en otras fuentes bibliográficas (Finberg y col., 1992).

La incorporación no específica se determinó incubando la misma cantidad de radioligando en presencia de un exceso de noradrenalina fría (3 mM) y a una temperatura de 0 - 4 °C, a la cual el transportador no es funcional y, por tanto, solo se fijará radioligando a lugares inespecíficos. Para determinar el efecto de la captación no neuronal se realizaron unos experimentos en presencia de β-estradiol 3,17 bisulfato a fin de bloquearlo y compararlo con la incorporación total. Debido a que no se encontró diferencia, los experimentos siguientes se realizaron en ausencia de dicho esteroide.

Pasados los 3 min. de incubación, se sacaron, con ayuda de unas pinzas, los órganos de los tubos y se procedió al lavado secuencial de los mismos 4 veces en 200 ml de solución de Krebs-Henseleit fría (0 - 4 °C). Seguidamente, se introdujeron en viales de centelleo y se les añadió 0,5 ml de solubilizador de tejidos (Solvable[®]), dejándose disolver en un baño María a 50 °C durante 3h.

Una vez solubilizados, se retiraron del baño, se dejaron alcanzar la temperatura ambiente y se les añadió 10 ml de cóctel de centelleo Ecolite[®](+). Pasados 30 min. se procedió al conteo de la radiactividad incorporada mediante un contador de centelleo (Beckman LS 1800), con una eficiencia de conteo alrededor del 40 %.

4.3.- Tratamiento de los resultados.

A fin de determinar la eficiencia en el conteo de las muestras experimentales a partir de las cpm obtenidas, se realizaron controles de eficiencia a partir de fragmentos de partes prostáticas de peso similar a la de las otras muestras. Para ello, los tejidos se colocaron en el vial de centelleo y se les añadió 50 µl de la dilución de noradrenalina tritiada, de actividad conocida y, por tanto, se podían calcular las dpm teóricas a partir de ellas. Al añadirse el cóctel de centelleo y procederse al conteo de la muestra, se podía relacionar el valor en cpm obtenido con las dpm teóricas teniendo, por lo tanto, la eficiencia.

Una vez pasadas las cpm a dpm de las muestras problema, en función de la eficiencia calculada, la actividad de cada una se refirió a la unidad de peso del tejido dividiendo por el respectivo peso en mg. Seguidamente se restó el valor en dpm correspondiente a la incorporación inespecífica y la cantidad de [³H]NA incorporada en fmoles se calculó a partir de las dpm dividiendo por la actividad específica del radioligando (Ci/mmol). El porcentaje de inhibición del *uptake* a las diferentes concentraciones de inhibidor se calculó respecto a la incorporación total (en ausencia de inhibidor).

Los resultados, en porcentaje de incorporación, se introdujeron en el programa de regresión no lineal GraphPAD InPlot (GraphPAD software, San Diego, CA, USA), que proporcionó el valor de la concentración inhibitoria 50 % (CI₅₀) para cada ligando.

5.- EXPERIMENTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL.

5.1.- Fundamento.

Una vez estudiados los efectos de los ligandos sigma y PCP ensayados sobre el transporte de la noradrenalina mediante técnicas *in vitro* se pasó a estudiar el efecto de uno de ellos, el MK-801, en animal entero. Ya que el MK-801 provocaba una potenciación de las respuestas a NA, sería de esperar que esta potenciación, a nivel sistémico, se tradujera en un incremento de la presión arterial.

Los experimentos en animal entero presentan una serie de características que los hacen complementarios de los *in vitro*, ya que indican con mayor probabilidad el efecto que tendrán los fármacos en el organismo sometidos a los mecanismos de regulación de éste, aunque a veces es más difícil precisar con exactitud los lugares y mecanismos de acción.

En el aspecto técnico cabe destacar que, dada la gran variabilidad biológica de los animales *in vivo*, se tienen que considerar especialmente las condiciones de la preparación: anestesia, respiración, temperatura corporal, etc.

La preparación elegida ha sido el montaje de presión arterial cruenta en rata anestesiada. Ha de tenerse en cuenta que la modificación farmacológica de la presión arterial en un animal vivo no es un fenómeno simple, sino la integración de mecanismos diferentes que se pueden resumir en:

- Sobre el contenido vascular:
 - Acciones cardíacas.
 - Acciones sobre la volemia real.
 - Acción sobre la volemia efectiva (retorno venoso).

- Sobre la resistencia vascular.
- Sobre el SNC.

5.2.- Animales empleados y procedimiento quirúrgico.

Los animales utilizados en estos experimentos han sido ratas Wistar macho adultas, de peso comprendido entre 250-325 g, estabuladas bajo las mismas condiciones que las utilizadas en los otros experimentos.

El estudio se realizó en rata normal, rata reserpinizada y rata desmedulada.

5.2.a.- Rata normal.

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (70 mg/kg, 10 ml/kg, ip) y a continuación se procedió quirúrgicamente a su preparación para el experimento canulando las vías necesarias.

La técnica general de canulación de cualquier estructura orgánica tubular (vasos, tráquea, etc.) conlleva pasar dos hilos a su alrededor; el que queda en sentido distal servirá para detener el flujo sanguíneo que saldría al exterior, mientras que el otro se ata alrededor de la cánula y sirve para fijarla al vaso.

Para poder introducir la cánula en los vasos se realiza una incisión entre los dos hilos mediante una aguja de jeringa en la dirección de la canulación. En el caso de los vasos se ha de ir con cuidado con la disección de sus cubiertas serosas a fin de evitar canulaciones extravasculares. Seguidamente, se introduce la cánula con mucho cuidado y se entra el trozo suficiente para que pueda ser atado por encima con uno de los hilos. Los vasos canulados fueron los siguientes:

- La vena femoral derecha. Fue la vía de administración de los fármacos (fig. 13).
- La vena yugular izquierda. Permitía administrar una dosis de mantenimiento de anestésico mediante perfusión.
- La arteria carótida izquierda. Conectada a través de la cánula al transductor de presión era la que proporcionaba el registro de la misma (fig. 14).

Para la canulación de los vasos se empleó tubo de polietileno de diámetro externo 1 mm para la arteria carótida (diámetro interno 0,5 mm) y de 0,61 mm para las venas femoral y yugular (diámetro interno 0,28 mm). Las cánulas contenían suero fisiológico heparinizado (0,5 %) y estaban conectadas a la aguja de una jeringuilla de 1 ml llena de suero fisiológico.

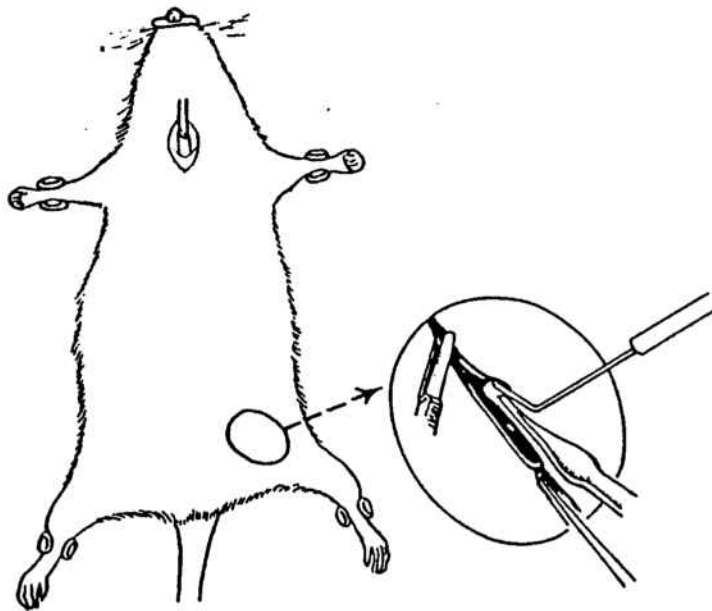


Figura 13.- Canulación de la vena femoral.

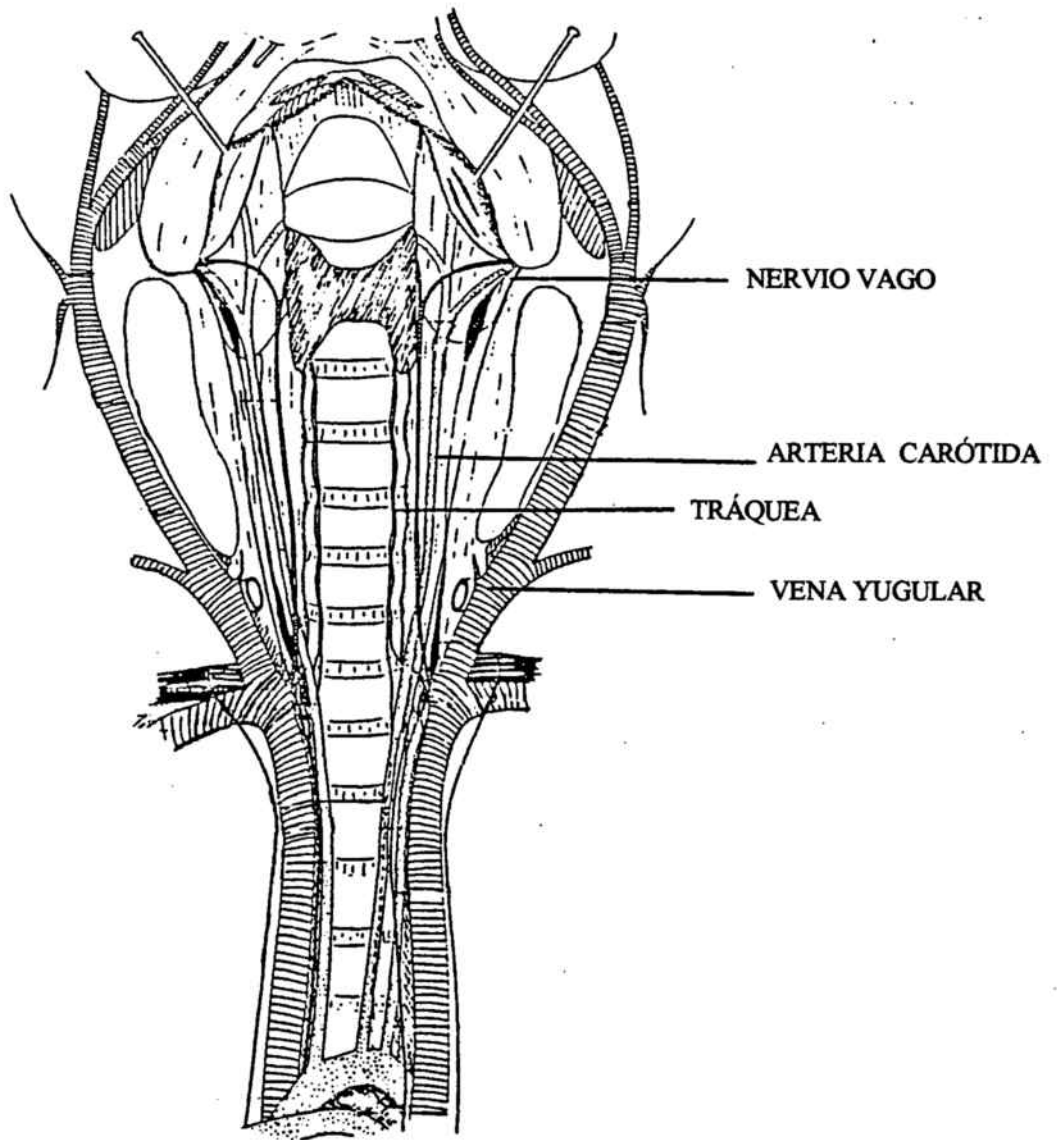


Figura 14.- Localización anatómica de la arteria carótida, la vena yugular, la tráquea y el nervio vago.

A continuación se practicaba también una traqueotomía para evitar la obturación de la tráquea por el aumento de secreciones provocado por el pentobarbital.

Como el centro termorregulador del SNC se encuentra deprimido durante la anestesia, los animales pequeños como la rata pueden sufrir pérdidas importantes de calor a través de la piel y del intercambio de gases de la respiración, produciéndose una hipotermia. Por ello, la temperatura del animal era mantenida a 37 °C mediante una manta eléctrica en función de la temperatura rectal proporcionada por una sonda conectada a un termostato (temperature control unit HB 101/2, Letica).

Una vez finalizado el procedimiento quirúrgico, la cánula de la carótida se conectó a un transductor de presión (Letica TRI-021) acoplado a un amplificador PRS-205 y éste a un registrador Unigraph 1000 (ambos de Letica).

A continuación, la cánula de la yugular se conectaba a una jeringa impulsada por un perfusor (Harvard Apparatus, Pump 22) que proporcionaba una dosis de mantenimiento de pentobarbital de 12 mg/kg/h en un volumen de 1 ml/h.

El animal así montado se dejaba estabilizar 30 minutos antes de empezar la administración de los fármacos.

Vagotomía bilateral.

A algunas ratas se les practicó una vagotomía bilateral para determinar si las variaciones de presión observadas se debían a un reflejo mediado por el sistema parasimpático. Al seccionar los nervios vagos (situados al lado de las carótidas) se interrumpe la transmisión parasimpática mediada por los mismos.

5.2.b.- Rata reserpinizada.

La administración de la reseпина se llevó a cabo de la misma forma descrita en el apartado 2.6.b de esta sección, 16 h antes de iniciar el experimento.

La preparación quirúrgica y medida de la presión arterial se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el apartado anterior.

5.2.c.- Rata desmedulada.

Finalidad.

La preparación farmacológica de la rata desmedulada fue descrita en el año 1947 por Shipley y Tilden y desde entonces ha sido muy utilizada para el estudio de los efectos presores de los fármacos. En esta preparación, tanto el encéfalo como la médula espinal quedan destruidos, el tono simpático vasoconstrictor se anula y se pierden los controles centrales y reflejos del sistema cardiovascular. Por ello también se tiene que mantener artificialmente la respiración y la temperatura. El animal desmedulado presenta una presión arterial media baja (45-50 mm Hg), pero ésta es más estable y sensible a los agentes presores que en el animal no desmedulado. Dado que el control neurogénico de la presión se elimina, la presión arterial se mantiene por acción del sistema renina-angiotensina, por la vasopresina y, principalmente, por las propiedades intrínsecas del sistema cardiovascular (Carbonell y col., 1986).

Preparación.

Una vez anestesiado el animal con pentobarbital (80 mg/kg) se colocaba sobre una tabla quirúrgica donde se le practicaba una traqueotomía y se canulaba la tráquea, que se conectaba a una bomba de respiración (Harvard Apparatus). El número de emboladas por minuto y el volumen de cada embolada se calcula en función del peso del animal. En general, para animales pequeños (70-800 g) el volumen de aire por embolada es pequeño y el número de emboladas es grande, mientras que en animales grandes (1-40 kg) se da la situación contraria. En el caso de la rata, se han calculado unas 60 emboladas por minuto, con un volumen de embolada de 1 ml por cada 100 g de peso (Flavahan y McGrath, 1981).

Seguidamente se procedía a la desmedulación: se mantenía la rata vertical, sosteniéndola con un mano por el cráneo de tal manera que la columna vertebral quedara en línea recta, mientras que con la otra mano se introducía oblicuamente una varilla metálica de unos 25 cm de largo y de 1,5 mm de diámetro (con un extremo puntiagudo), formando un ángulo de 45° con la columna vertebral, a través de una órbita ocular y del *foramen magnum* de manera que atravesara hasta el final la columna vertebral y se destruyera toda la médula espinal. Una vez desmedulada la rata, la varilla no se extraía, a fin de impedir la hemorragia.

A continuación se canulaba la vena femoral derecha para administrar los fármacos, y la carótida izquierda para la medida de la presión. También se practicó una vagotomía bilateral y se ligó la carótida no canulada para evitar el riego sanguíneo al cerebro y suprimir cualquier indicio de actividad central.

La temperatura se mantenía a 37 °C mediante una manta eléctrica en función de la temperatura rectal.

Finalizado el montaje, se dejaron 30 min. de estabilización antes de administrar los fármacos.

5.3.- Protocolo experimental.

5.3.a.- Administración del MK-801.

Una vez pasado el tiempo de estabilización del animal, si éste mantenía un registro de presión constante, se procedía a iniciar las administraciones de fármaco. Antes de administrar el MK-801 se realizaba una administración del mismo volumen de suero fisiológico (1 ml/kg) con la finalidad de determinar el incremento de presión debido al aumento de volemia provocado por el vehículo. Pasados 15 min. de estabilización, se procedía a administrar el MK-801 a diferentes dosis, dejando 15 min,

de recuperación entre las administraciones. Las dosis utilizadas fueron 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 y 0,3 mg/kg.

5.3.b.- Propranolol.

Considerando la posibilidad de que la caída de presión subsiguiente a la subida inicial observada tras administrar el MK-801 fuera debida a un efecto β -adrenérgico, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se administró el antagonista β -adrenérgico propranolol previamente al MK-801.

La pauta seguida fue, una vez estabilizada la rata, administrar una dosis de propranolol (se probó 1, 3 y 5 mg/kg) y, a los 5 min. aproximadamente, cuando se estabilizaba el registro, se administraba el MK-801.

5.3.c.- Prazosina.

Este antagonista α_1 -adrenérgico se empleó para determinar si el aumento inicial de presión arterial al administrar el MK-801 era mediado por estos receptores.

La dosis empleada se fijó de tal manera que fuera capaz de inhibir la subida de presión provocada por 3,3 μ g/kg de adrenalina (10 nmol/kg), siendo pues de 0,08 mg/kg.

El protocolo seguido consistía en, una vez estabilizado el animal, administrar la prazosina, esperar que se estabilizara la presión y, seguidamente, administrar el MK-801.

5.3.d.- Potenciación del efecto presor de la noradrenalina.

Debido a que la respuesta presora del MK-801 *per se* era, aunque significativa, pequeña, se evaluó el grado de potenciación que inducía este compuesto sobre la respuesta presora originada por la administración de una dosis de noradrenalina. Si el

efecto del MK-801 se debía a una inhibición de la recaptación de noradrenalina, la respuesta presora a una dosis de dicho neurotransmisor debería potenciarse.

Los experimentos se realizaron en rata desmedulada, tal y como se detalla en el apartado 5.2.c de esta sección. Una vez estabilizado el animal y evaluado el efecto del vehículo (suero fisiológico 1 ml/kg) se administraron dos dosis de NA de 0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,5 nmol/kg) espaciadas 10 min. entre ellas, que servirían de control. Pasados 10 min. más, se administró el MK-801 (0,3 mg/kg) y a los 3 min. se administró de nuevo la NA, calculándose el porcentaje de potenciación respecto al control.

5.4.- Análisis de los datos.

Los valores de presión arterial se obtuvieron contando manualmente el desplazamiento (en mm) de la pluma del registrador y pasándolos a mm Hg en función del fondo de escala seleccionado (normalmente, 1 mm en el papel equivalía 2 mm Hg).

El valor de incremento neto de presión se calculó restando el valor del incremento provocado por el vehículo del incremento provocado por el fármaco.

Todos los resultados se han expresado como la media \pm EEM (error estándar de la media) de n experimentos diferentes.

6.- FÁRMACOS, REACTIVOS Y MATERIAL EMPLEADOS.

6.1.- Fármacos y reactivos.

-Levo [7-³H]noradrenalina .

-[N-metil-³H]Nisoxetina·HCl

Obtenidos de New England Nuclear (Dreiech, Alemania)

-(+)-MK-801 Hidrogeno-maleato

Adquirido a Research Biochem. Int. (Natick, MA, USA).

- (+)-3-PPP.

- Adrenalina bitartrato.

- Colina·HCl

- Coomassie Brilliant Blue G-250

- Desipramina·HCl

- Dextrometorfano·HBr·H₂O.

- Fenciclidina·HCl

- Glicina.

- Haloperidol.

- Noradrenalina bitartrato.
- Pentobarbital sódico.
- Polietilenimina (sol. acuosa al 50 % v/v)
- Prazosina·HCl
- Propranolol
- Reserpina (metil reserpato éster del ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico).
- Tenociclidina·HCl
- Yohimbina·HCl

Obtenidos de Sigma, Chem. Co.(St. Louis, MO, USA).

- Dextrorfanol

Obtenido de ICN Biomedicals (Cleveland, OH, USA)

- D-AP5, adquirido a Tocris Cookson (St.Louis, MO, USA).
- Albúmina sérica bovina (Merck, Darmsadt, Alemania)
- Cóctel de centelleo Biogreen 1 (Scharlau, F.E.R.O.S.A., España)
- Cóctel de centelleo Ecolite (+) (ICN Biomedicals, Cleveland, OH, USA)
- Solubilizador de tejidos Solvable (Du Pont, Alemania)
- Las sales y reactivos de laboratorio de uso general se adquirieron a Panreac (Montplet & Esteban, S.A., España).

Las disoluciones *stock* de los fármacos, conservadas a -80 °C, excepto para la reserpina y el haloperidol, se prepararon con agua bidestilada y las diluciones de las mismas con solución de Krebs-Henseleit o con tampón Tris-HCl según la técnica a seguir. En el caso de que fueran a administrarse *in vivo*, las diluciones se prepararon en

suero fisiológico (NaCl 0,9 %). El haloperidol se disolvió en etanol y las diluciones se prepararon de tal manera que la concentración de etanol en la copa del baño o en el tubo de incubación fuera inferior al 0,1 %. La reserpina, debido a su poca solubilidad en agua se preparó en forma de suspensión, tal como se indica en el apartado 2.6.b El dextrorfanó requirió una mínima cantidad de etanol en el agua para disolverse y las diluciones se realizaron como se ha descrito para los otros compuestos.

6.2.- Material fungible.

- Filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B (2,5 mm). (Whatman Scientific Ltd., Maidstone, Kent, UK)
- Tubos de vidrio de borosilicato de 12 X 75 mm (Corning).
- Viales de centelleo de 20 ml (Servicios Hospitalarios, Barcelona)

6.3.- Aparatos.

- Amplificador de presión Letica PRS-205.
- Amplificadores Letica ISO 506.
- Aparato de filtración múltiple por vacío (Millipore)
- Baño de órganos de 4 copas Letica.
- Bomba de perfusión Harvard Apparatus, Pump 22.
- Centrífuga preparativa Beckman J2-21.
- Contador de centelleo líquido Beckman LS 1800.
- Espectrofotómetro Shimadzu U-1203.
- Estimulador Grass S88.
- Homogeneizador de tejidos Polytron (Kinematica).
- Registrador Letica PolyGraph 4006.
- Registrador Letica Unigraph 1000.
- Transductor de presión Letica TRI-021.
- Transductores de tensión isométricos Letica TRI 110.
- Ultracentrífuga Beckman L8-55M.
- Unidad de control de temperatura Letica HB 101/2.

RESULTADOS



1.- EXPERIMENTOS EN ÓRGANO AISLADO.

1.1.- Experimentos con MK-801.

1.1.a.- Efecto del MK-801 sobre las respuestas inducidas por estimulación eléctrica.

El MK-801 (3,7 μ M) *per se*, incrementó significativamente tanto las respuestas inducidas por estimulación eléctrica (46,60 % \pm 5,09, n = 6, $P < 0,05$) (fig. 1) como el tono basal en una solución de Krebs-Henseleit libre de magnesio. Este efecto potenciador incrementaba significativamente por la presencia de magnesio en el medio (251,75 % \pm 13,35, n = 6, $P < 0,02$).

Por lo tanto, a fin de obtener la máxima potenciación posible, todos los experimentos siguientes se llevaron a cabo con solución de Krebs-Henseleit con Mg^{2+} .

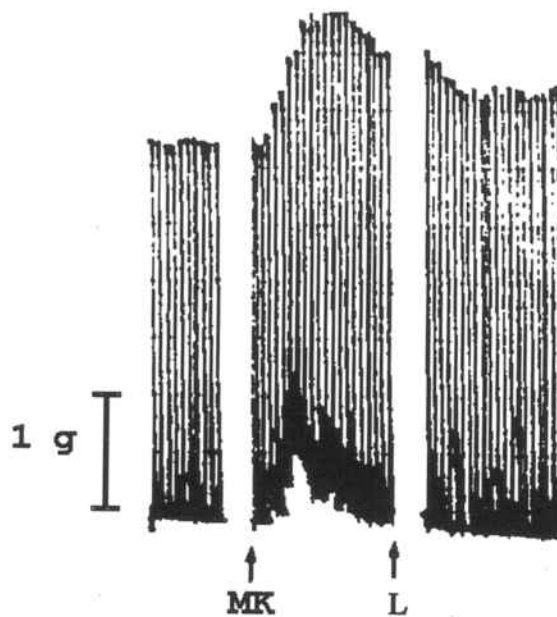


Figura 1.- Efecto del MK-801 ($3,7 \mu\text{M}$) sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en la porción epididimal del conducto deferente de rata en un medio libre de Mg^{2+} . "L" indica lavado del fármaco.

1.1.b.- Efecto del MK-801 sobre las respuestas inducidas por noradrenalina.

El MK-801, a las concentraciones ensayadas ($0,3$; $0,5$; 1 ; $2,7$ y $5,3 \mu\text{M}$) potenció de forma altamente significativa el efecto de la NA en las curvas concentración-respuesta acumulativas en la porción epididimal del conducto deferente de rata.

Dicha potenciación se tradujo en una disminución concentración-dependiente del valor de la concentración eficaz 50 (CE_{50}) para la NA (tabla I), así como en un desplazamiento de las correspondientes curvas sigmoideas hacia la izquierda (fig. 1). Para el MK-801 se obtuvo un valor de K_i (según Kenakin 1987) de $1,53 \times 10^{-9} \text{ M}$ para la potenciación del efecto de la NA. (fig. 2).

TABLA I: EFECTO DEL MK-801 SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA.

Concentración MK-801 (μM)	CE_{50} de NA (μM)	n
--	$0,99 \pm 0,11$	14
0,3	$0,57 \pm 0,29^{**}$	14
0,5	$0,38 \pm 0,02^{***}$	19
1	$0,23 \pm 0,06^{***}$	18
2,7	$0,09 \pm 0,009^{***}$	12
5,3	$0,06 \pm 0,01^{***}$	12

Los resultados están expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la t de Bonferroni: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. grupo control (ausencia de MK-801).

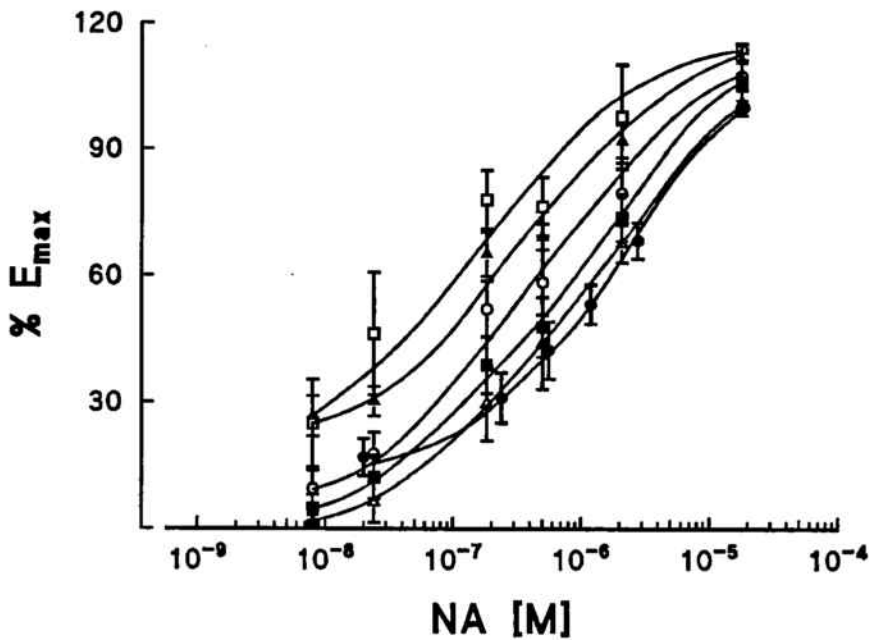


Figura. 2.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de MK-801. ● Control; Δ MK-801 0,3 μM ; ■ MK-801 0,5 μM ; ○ MK-801 1 μM ; ▲ MK-801 2,7 μM y □ MK-801 5,3 μM .

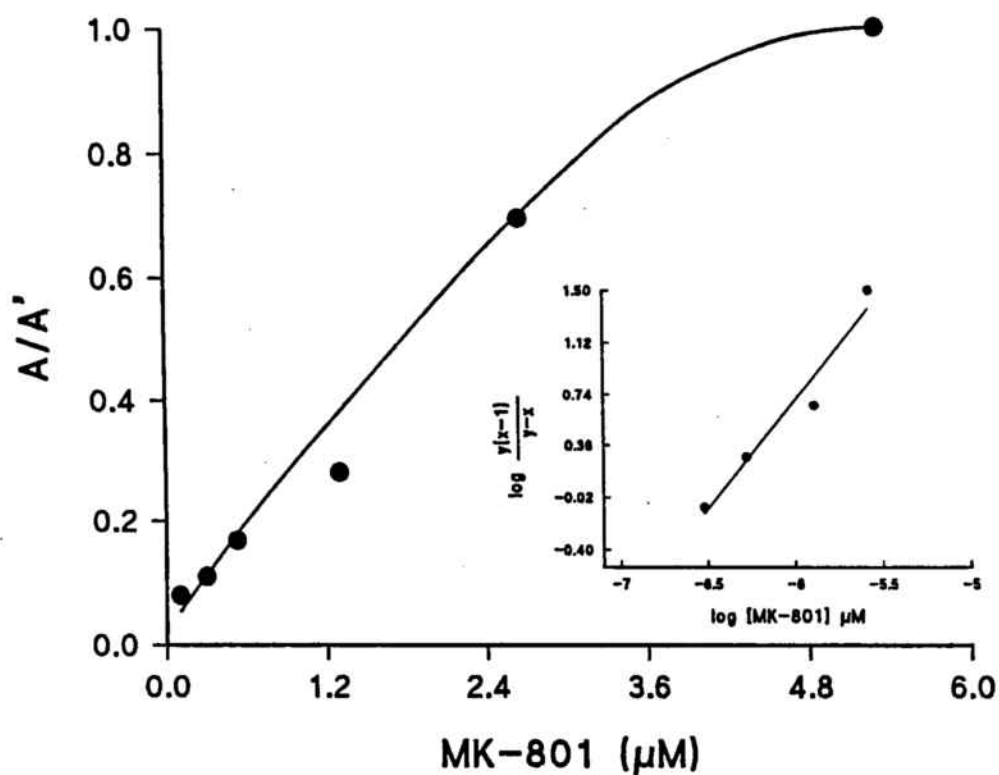


Figura 3.- Representación gráfica y regresión de la ecuación del apartado 2.9.c de *Materiales y métodos* para el cálculo de la K_i para el MK-801 como inhibidor de la captación de la NA.

Un ejemplo de los registros obtenidos en las curvas concentración-respuesta a NA en ausencia y presencia de MK-801 sería el siguiente:

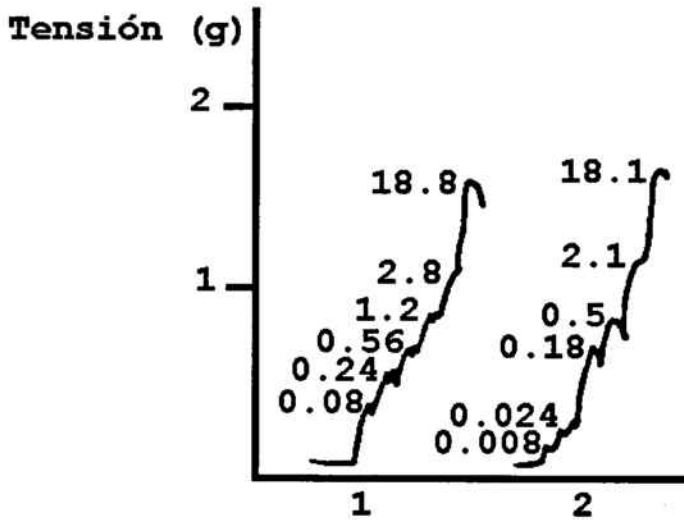


Figura 4.- Curvas concentración-respuesta acumulativas a NA en ausencia (1) y en presencia (2) de MK-801 (0,5 μ M). Las concentraciones de NA se indican (μ M) al lado de cada máximo de la curva.

1.1.c.-Experimentos encaminados a dilucidar el mecanismo de acción.

Efecto del MK-801 en órganos procedentes de ratas reserpinizadas.

La potenciación del efecto de la NA en las curvas concentración respuesta en deferentes que procedían de ratas reserpinizadas fue la misma que la obtenida con ratas no pretratadas. La diferencia entre las CE_{50} de las curvas realizadas en órganos de ratas reserpinizadas no resultó significativa frente a las obtenidas en deferentes de ratas no pretratadas, tal como se muestra en la tabla II. Asimismo, dado que la potenciación del efecto de la NA por MK-801 no depende de los depósitos endógenos del neurotransmisor, se descarta que este efecto sea debido a un aumento en la liberación de NA endógena.

TABLA II : COMPARACIÓN CE₅₀ A NA EN DEFERENTES DE RATAS NORMALES Y RESERPINIZADAS, EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MK-801			
Curva	CE₅₀ de NA (μM)	n	Significación
Control Normal	0,99 ± 0,11	14	ns, <i>P</i> > 0,05
Control Reserpinizadas	0,84 ± 0,12	12	
MK-801 2,7 μM normal	0,09 ± 0,009	12	ns, <i>P</i> > 0,05
MK-801 2,7 μM reserp.	0,11 ± 0,015	7	
MK-801 5,3 μM normal	0,06 ± 0,01	12	ns, <i>P</i> > 0,05
MK-801 5,3 μM reserp.	0,06 ± 0,02	3	

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada por ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni.

Experimentos realizados con baja concentración de sodio.

Al sustituir el cloruro sódico de la solución de Krebs-Henseleit por una concentración equimolar de cloruro de colina, se anuló la potenciación del efecto de la NA por el MK-801 (fig. 4), sugiriendo una implicación del sistema de transporte para este neurotransmisor en dicho efecto.

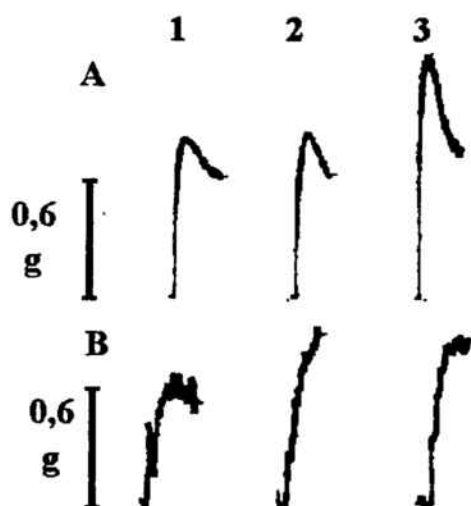


Figura 5.- Registro de las respuestas a NA (1,6 μM) en presencia (A) y a baja concentración de sodio (B) en el medio, y en ausencia (1 y 2) y en presencia (3) de MK-801 (2,7 μM) en dos órganos procedentes del mismo animal.

Experimentos en presencia de yohimbina.

La adición de yohimbina (0,13 μ M) 10 minutos antes de la realización de las curvas concentración-respuesta acumulativas a NA no modificó significativamente la respuesta a NA exógena.

Asimismo, la presencia de este antagonista α_2 en el medio no afectó a la potenciación del efecto de la NA por el MK-801 a la concentración de 5,3 μ M.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA III: EFECTO DE LA YOHIMBINA SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA, EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE MK-801 (5,3 μM)			
Curva	CE₅₀ de NA (μM)	Comparación	n
Control	1 \pm 0,08	ns	4
Yohimbina (0,13 μ M)	1,13 \pm 0,1		4
MK-801 (5,3 μ M)	0,06 \pm 0,01	ns	12
MK-801 (5,3 μ M) + Yohimbina (0,13 μ M)	0,08 \pm 0,04		4

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada por ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: ^{ns} no significativo.

La comparación estadística (ANOVA) entre la CE₅₀ de NA en presencia de MK-801 (5,3 μ M.) sin yohimbina en el medio (apartado 1.1.b) y la obtenida en presencia de este antagonista α_2 proporcionó un valor de $P > 0,8$, con lo cual la diferencia no es significativa.

Experimentos en presencia de NMDA y glicina.

La adición previa de NMDA (300 μM) y glicina (10 μM) al medio no modificó significativamente la potenciación de las curvas concentración-respuesta a NA por parte del MK-801. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla

TABLA IV: EFECTO DEL NMDA + GLICINA SOBRE LA POTENCIACIÓN POR MK-801 (5,3 μM)		
Curva	CE₅₀ de NA (μM)	n
MK-801 (5,3 μM)	0,09 \pm 0,01	7
MK-801 (5,3 μM) + (NMDA + Glicina)	0,14 \pm 0,03 ^{ns}	7

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes.

Comparación entre los dos grupos en presencia de MK-801: ANOVA. ^{ns}: $P > 0,05$, diferencia no significativa.

Experimentos en presencia de AP5.

El AP5, antagonista competitivo del receptor NMDA, a una concentración de 10 μM , no consiguió potenciar, sino que más bien inhibió, las contracciones inducidas por NA exógena (tabla V)

TABLA V: EFECTO DEL AP5 (10 μM) EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA		
Curva	CE₅₀ de NA (μM)	n
Control	0,99 \pm 0,05	8
AP5 (10 μM)	1,58 \pm 0,06 ^{***}	4

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA: ^{***} $P < 0,001$ vs. grupo control (ausencia de AP5)

1.1.d.- Efecto del MK-801 sobre la tensión basal.

El MK-801, a la concentración de 5,3 μM , inducía respuestas contráctiles espontáneas que oscilaban entre 0,15 y 0,95 g de tensión, en la porción epididimal del conducto deferente de rata (fig. 6). Esta actividad espontánea se mantenía durante al menos 30 min. en presencia del fármaco. La adición de prazosina (1 μM) anuló completamente este efecto (fig. 7), indicando que el mismo se debía a la interacción de NA con los receptores α_1 , mientras que la adición del agonista NMDA (300 μM) más glicina (10 μM) era incapaz de revertirlo (fig. 8). Asimismo, dicha actividad espontánea tampoco se inhibió por la adición de yohimbina a la concentración de 0,13 μM .

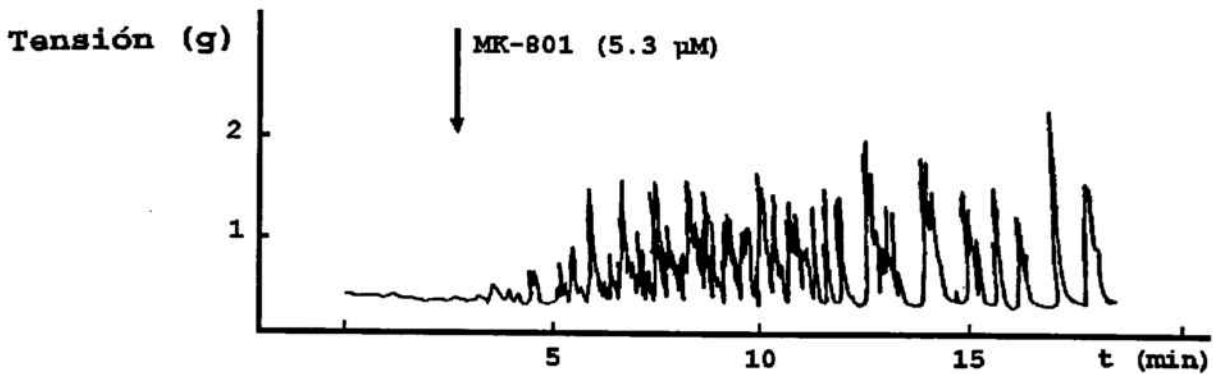


Figura 6.- Ejemplo de registro de la actividad espontánea inducida por el MK-801 en la porción epididimal del conducto deferente de rata. La flecha indica el momento de adición del compuesto.

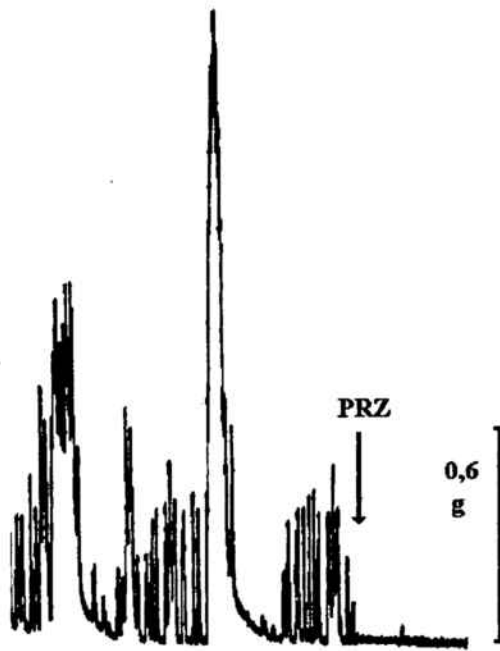


Figura 7.- Anulación de la actividad espontánea inducida por MK-801 al añadir 1 μ M de prazosina (PRZ) en la porción epididimal del conducto deferente de rata.

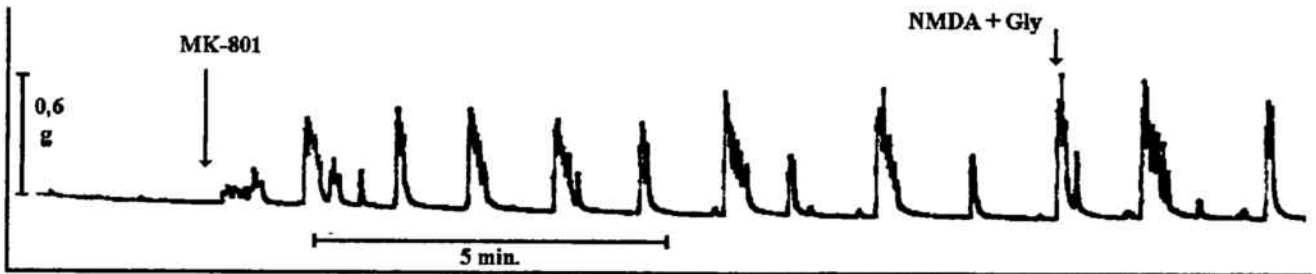


Figura 8.- Ausencia de efecto del NMDA + Glicina sobre la actividad espontánea inducida por el MK-801.

Por otra parte, el efecto del MK-801 sobre la tensión basal en conductos deferentes que procedían de ratas reserpinizadas era nulo (fig. 9), al no observarse las contracciones espontáneas que tenían lugar en órganos de ratas no pretratadas. Sin embargo, la actividad espontánea aparecía si los tejidos reserpinizados se incubaban con

NA (16 μ M durante 3 min.) previo a la adición del MK-801, con el fin de recargar las reservas de neurotransmisor.

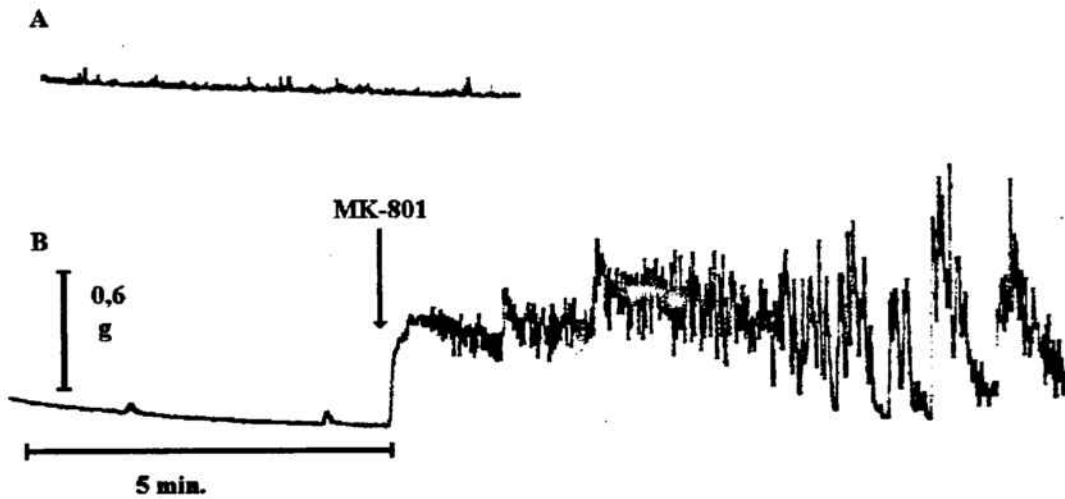


Figura 9.- Registro de la actividad espontánea inducida por el MK-801 en un órgano procedente de una rata reserpinizada, antes (A) y después (B) de incubarlo con NA. La flecha indica el momento de adición del compuesto.

1.2.- Experimentos con otros ligandos sigma y PCP.

1.2.a.- Efecto sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica.

Todos los compuestos ensayados, excepto el haloperidol, fueron capaces de potenciar, en mayor o menor grado, las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en la porción epididimal aislada del conducto deferente de rata. Las curvas concentración-efecto (% potenciación) se muestran en la figura 10, y las CE_{100} calculadas para cada compuesto que potenció en la tabla VI. El haloperidol (1 μ M) inhibió un $35,36 \pm 4,83$ % ($n = 4$, $P < 0,05$) dichas contracciones.

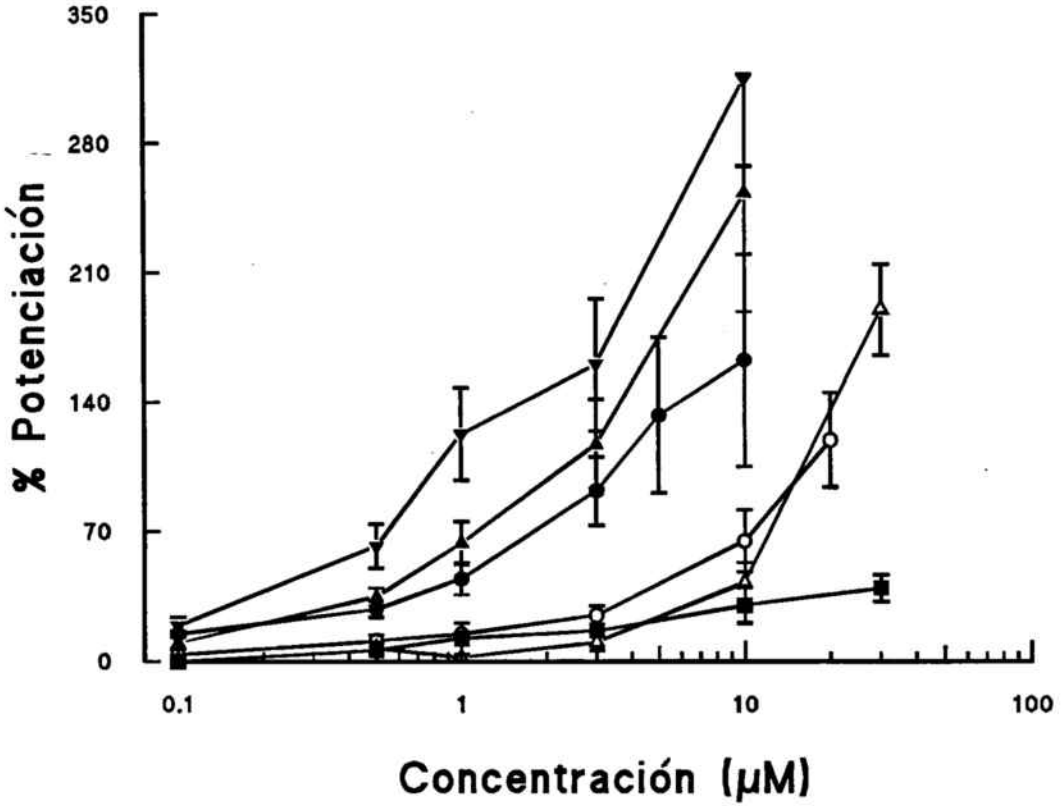


Figura 10.- Curvas concentración-efecto de los diferentes ligandos σ y PCP ensayados sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica en la porción epididimal del conducto deferente de rata: \blacktriangle PCP; \circ TCP; \bullet MK-801; \blacksquare dextrofan; \triangle dextrometorfano y \blacktriangledown (+)-3-PPP.

TABLA VI: EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS ENSAYADOS EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS ELÉCTRICAMENTE		
Compuesto	r	CE₁₀₀ (μM)
PCP	0,97	1,58
TCP	0,92	22,38
MK-801	0,98	2,88
DEXTRORFANO	--	> 1000
DEXTROMETORFANO	0,93	12,59
HALOPERIDOL	--	inhibidor
(+)-3-PPP	0,97	0,87

1.2.b.- Efecto sobre las contracciones inducidas por NA exógena.

Tenociclidina (TCP)

El TCP, otro ligando del sitio ubicado en el canal iónico asociado al receptor NMDA, también potenció el efecto de la noradrenalina en las curvas concentración-respuesta acumulativas, a todas las concentraciones ensayadas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA VII: EFECTO DEL TCP EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA		
Concentración de TCP (μM)	CE₅₀ de NA (μM)	n
--	0,78 ± 0,05	63
0,3	0,81 ± 0,12 ^{ns}	3
0,5	1,10 ± 0,40 ^{ns}	6
1	0,20 ± 0,02 ^{***}	14
3	0,20 ± 0,02 ^{***}	10
5	0,064 ± 0,01 ^{***}	10
10	0,069 ± 0,01 ^{***}	12

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: ^{ns} no significativo, ^{***} *P* < 0,001 vs. grupo control (ausencia de TCP).

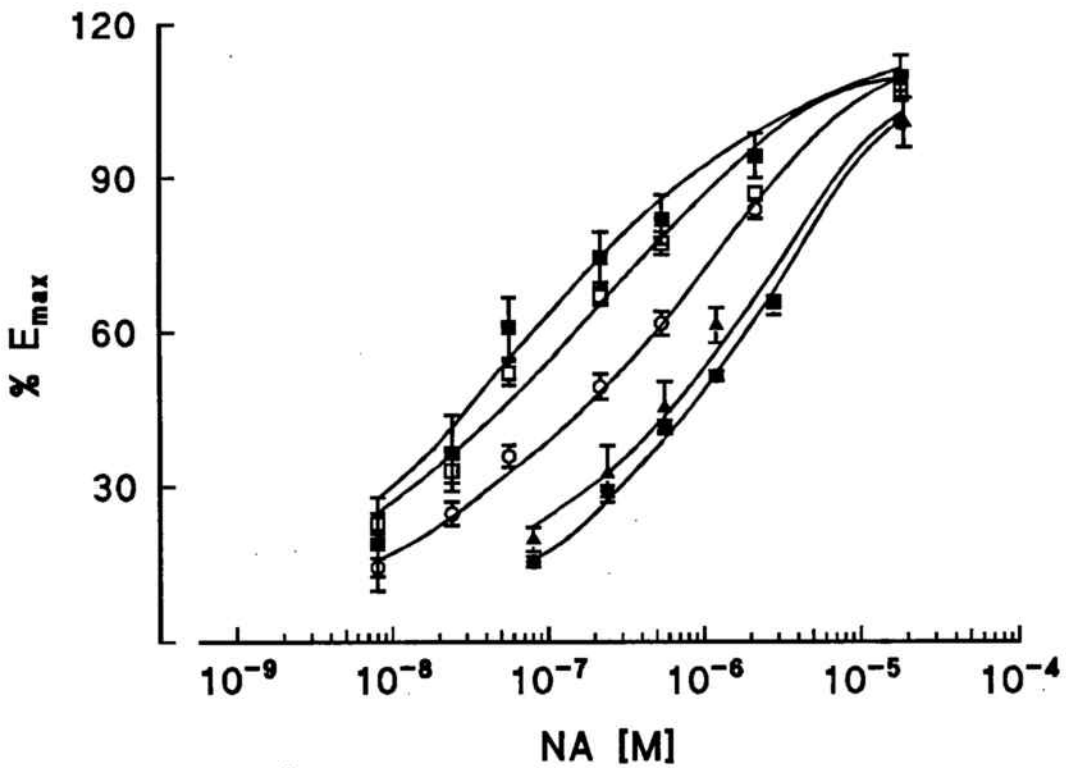


Figura 11.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de TCP: ● Control; ▲ TCP 0,3 μM; ○ TCP 1 μM; □ TCP 5 μM y ■ TCP 10 μM.

Además, el TCP, a la concentración más alta ensayada en las curvas acumulativas (10 μM) inducía a la preparación actividad espontánea del mismo tipo que la producida por el MK-801, que desaparecía al adicionar prazosina.

Fenciclidina (PCP)

Tal y como se muestra en la tabla VIII, las contracciones por NA fueron incrementadas de forma concentración-dependiente cuando se añadía a la copa del baño diferentes concentraciones de PCP comprendidas entre 0,1 y 5 μM (fig. 10).

TABLA VIII: EFECTO DEL PCP EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA

Concentración de PCP (μM)	CE_{50} de NA (μM)	n
--	$1,15 \pm 0,06$	31
0,1	$0,51 \pm 0,04^{***}$	7
0,5	$0,27 \pm 0,03^{***}$	7
1	$0,17 \pm 0,02^{***}$	10
5	$0,04 \pm 0,01^{***}$	8

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: *** $P < 0,001$ vs. grupo control (ausencia de PCP).

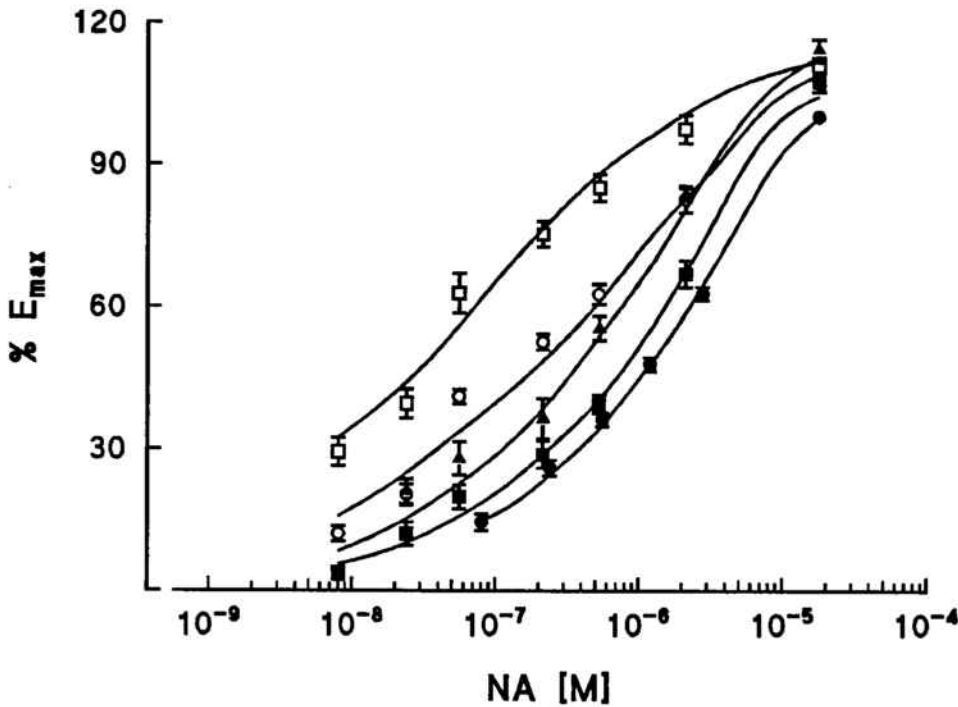


Figura 12.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de PCP: ● Control; ■ PCP 0,1 μM ; ▲ PCP 0,5 μM ; ○ PCP 1 μM y □ PCP 5 μM .

De forma análoga que el TCP, el PCP también inducía actividad espontánea en la musculatura lisa de la porción epididimal del conducto deferente de rata, a las concentraciones más altas ensayadas. Dicha actividad desaparecía al añadir prazosina.

Dextrorfanano (DX)

El dextrorfanano, metabolito del dextrometorfano perteneciente al grupo de ligandos PCP, también mostró un efecto potenciador de la NA a concentraciones comprendidas entre 1 y 10 μM . Las curvas concentración-respuesta se desplazan hacia la izquierda de manera concentración-dependiente.

TABLA IX: EFECTO DEL DEXTRORFANO EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA		
Concentración de DX (μM)	CE₅₀ de NA (μM)	n
--	1,09 \pm 0,05	33
1	0,7 \pm 0,09**	11
3	0,55 \pm 0,09***	11
10	0,34 \pm 0,05***	11

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. grupo control (ausencia de dextrorfanano).

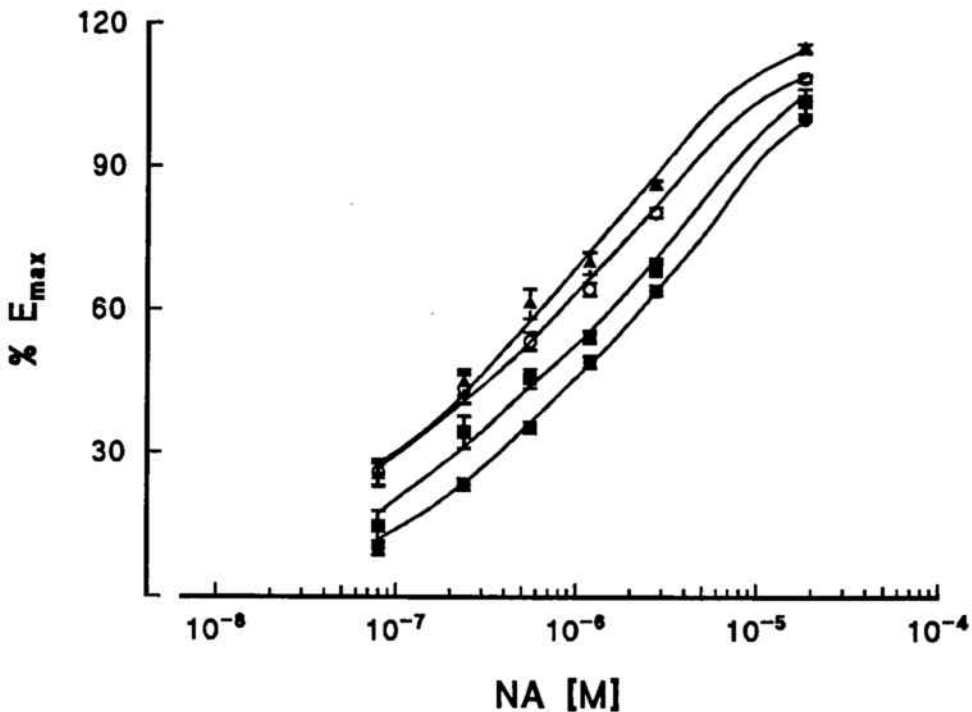


Figura 13.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de dextrorfanano: ● Control; ■ DX 1; ○ DX 3 μM ; ▲ DX 10 μM .

A 10 μM se observó cierta actividad espontánea, suprimible por prazosina; aunque muy débil comparada con la inducida por el MK-801, el TCP o el PCP.

Dextrometorfano (DM)

La adición de dextrometorfano, ligando σ , a las concentraciones ensayadas, no provocó una disminución estadísticamente significativa de las CE_{50} para la NA en las curvas concentración-respuesta. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA X: EFECTO DEL DEXTROMETORFANO EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA		
Concentración de DM (μM)	CE_{50} de NA (μM)	n
--	$0,94 \pm 0,07$	12
1	$0,69 \pm 0,09^{\text{ns}}$	7
5	$0,62 \pm 0,12^{\text{ns}}$	7

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: ^{ns} diferencia no significativa vs. grupo control (ausencia de dextrometorfano).

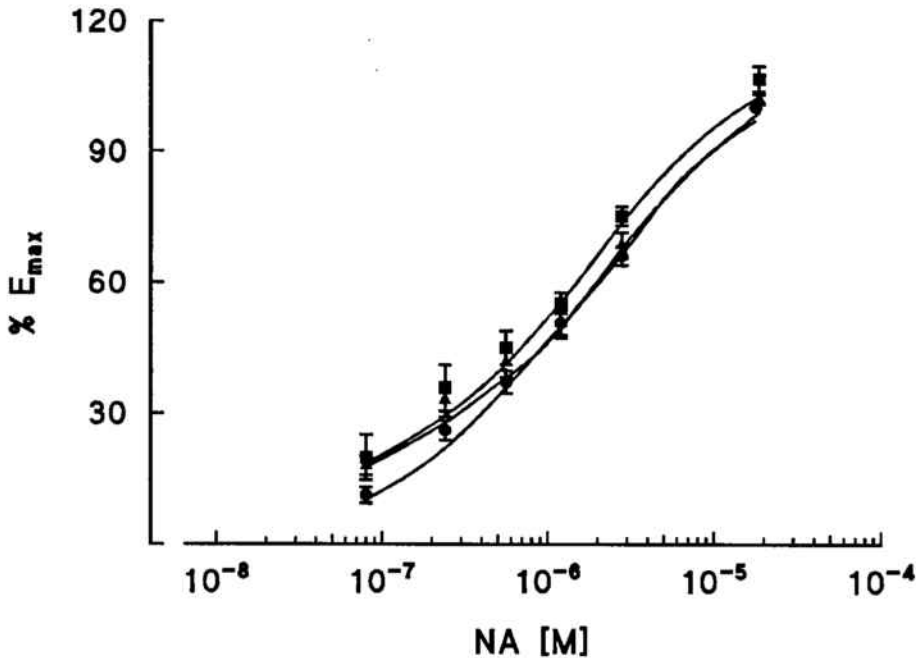


Figura 14.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de dextrometorfano: ● Control; ▲ DM 1 μM y ■ DM 5 μM .

Haloperidol (HP)

Al contrario que el resto de compuestos, el haloperidol provocó un efecto inhibitor de las contracciones inducidas por NA y con ello un aumento del valor de la CE_{50} para este neurotransmisor (Tabla XI). Aunque se producía inhibición, se consiguió alcanzar el mismo efecto máximo que se obtenía en su ausencia (control) (fig. 15).

El antagonismo que mostró el haloperidol resultó ser de tipo no competitivo, ya que las pendientes de las curvas concentración-respuesta a NA en presencia y ausencia de este fármaco son significativamente diferentes ($P < 0,01$).

TABLA XI: EFECTO DEL HALOPERIDOL EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA		
Concentración de HP (μM)	CE_{50} de NA (μM)	n
--	$0,83 \pm 0,14$	7
1	$2,22 \pm 0,11^{****}$	7

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA: **** $P < 0,0001$ vs. grupo control (ausencia de HP).

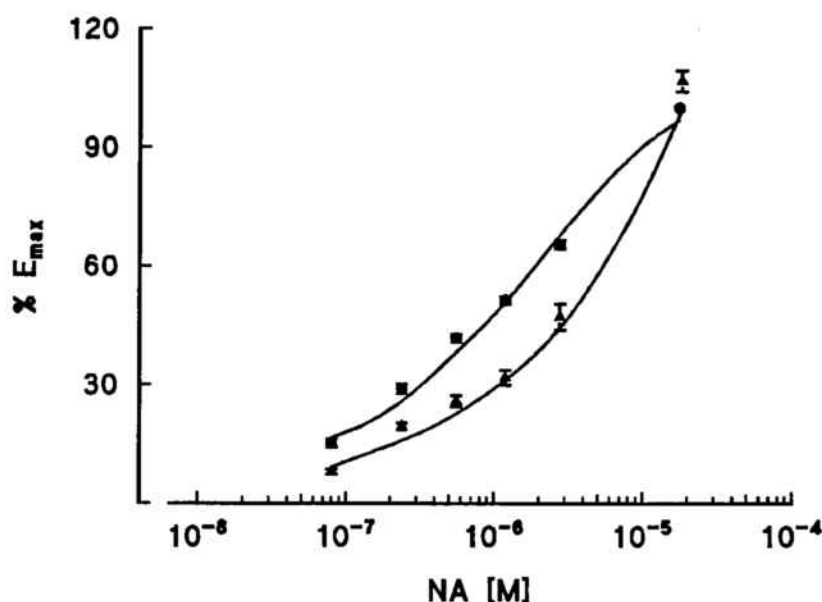


Figura 15.- Curvas concentración-respuesta en presencia (1 μ M) y ausencia de haloperidol: ● Control; ▲ HP 1 μ M.

(+)-3-PPP

La adición a la copa del baño de la (R)-(+)-3-(3-hidroxifenil)-N-propilpiperidina ((+)-3-PPP) provocó una notable potenciación de las contracciones inducidas por NA. Dicha potenciación, como en el resto de compuestos ensayados, era dependiente de su concentración y provocaba una disminución de la CE_{50} para la NA (tabla XII) y un desplazamiento de las curvas concentración-respuesta hacia la izquierda (fig.16).

Asimismo, la adición de este compuesto también inducía la aparición de actividad espontánea, la cual era tan patente a las concentraciones más altas que impedía el registro de las curvas concentración-respuesta acumulativas. Por ello se optó por determinar la potenciación a concentraciones más altas de fármaco mediante la respuesta a una única concentración de NA (0,2 μ M), a fin de obtener los puntos necesarios para la curva concentración-efecto del final de este apartado.

TABLA XII: EFECTO DEL (+)-3-PPP EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA

Concentración de (+)-3-PPP (μ M)	CE_{50} de NA (μ M)	n
--	0,91 \pm 0,04	41
0,5	0,61 \pm 0,11*	5
1	0,49 \pm 0,04 ***	17
3	0,32 \pm 0,04***	10

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA y comparación entre pares de valores por test de la *t* de Bonferroni: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. grupo control (ausencia de (+)-3-PPP).

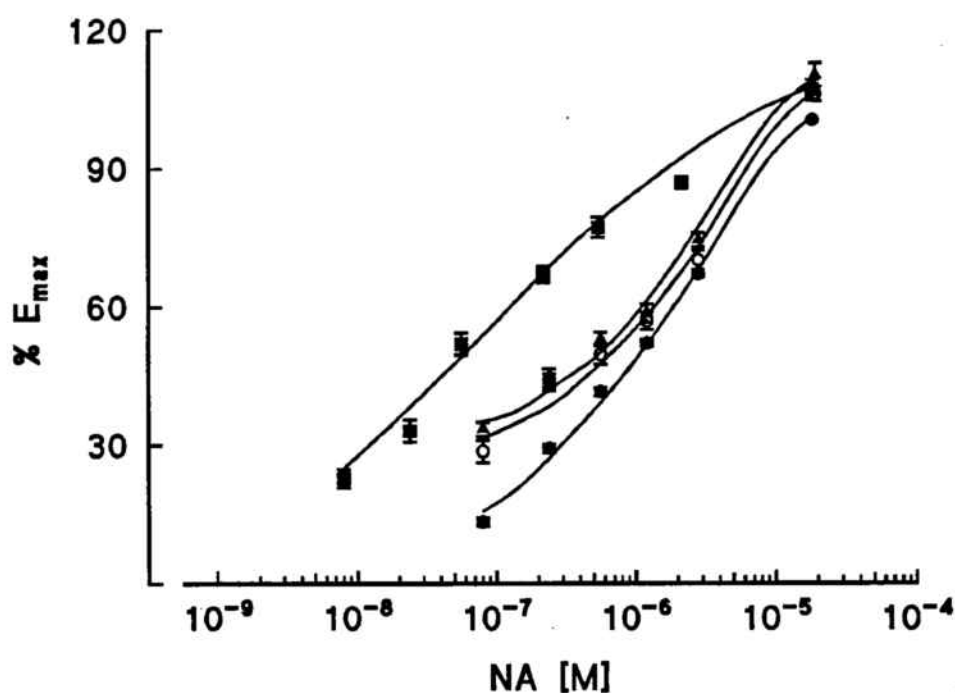


Figura 16.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de diferentes concentraciones de (+)-3-PPP: ● Control; ○ (+)-3-PPP 0,5 μM; ▲ (+)-3-PPP 1 μM.; ■ (+)-3-PPP 3 μM.

Estudio comparativo

Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de los diferentes compuestos ensayados (1 μM).

Tomando para todos los compuestos ensayados una misma concentración (1 μM), se ha realizado la comparación de las CE₅₀ para la NA en presencia de los mismos (tabla XIII), en la porción epididimal aislada del conducto deferente de rata, a fin de obtener un orden de potencias, que resultó ser:

PCP > TCP > MK-801 > (+)-3-PPP > Dextrorfano > Dextrometorfano

TABLA XIII: EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS ENSAYADOS EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA

Compuesto (1 μ M)	CE ₅₀ de NA (μ M)	n
PCP	0,17 \pm 0,02	10
TCP	0,20 \pm 0,02	14
MK-801	0,23 \pm 0,06	18
DEXTRORFANO	0,70 \pm 0,09	11
DEXTROMETORFANO	0,69 \pm 0,09	7
HALOPERIDOL	2,22 \pm 0,11	7
(+)-3-PPP	0,49 \pm 0,04	17

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. ANOVA: ** $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. los respectivos valores de CE₅₀ control.

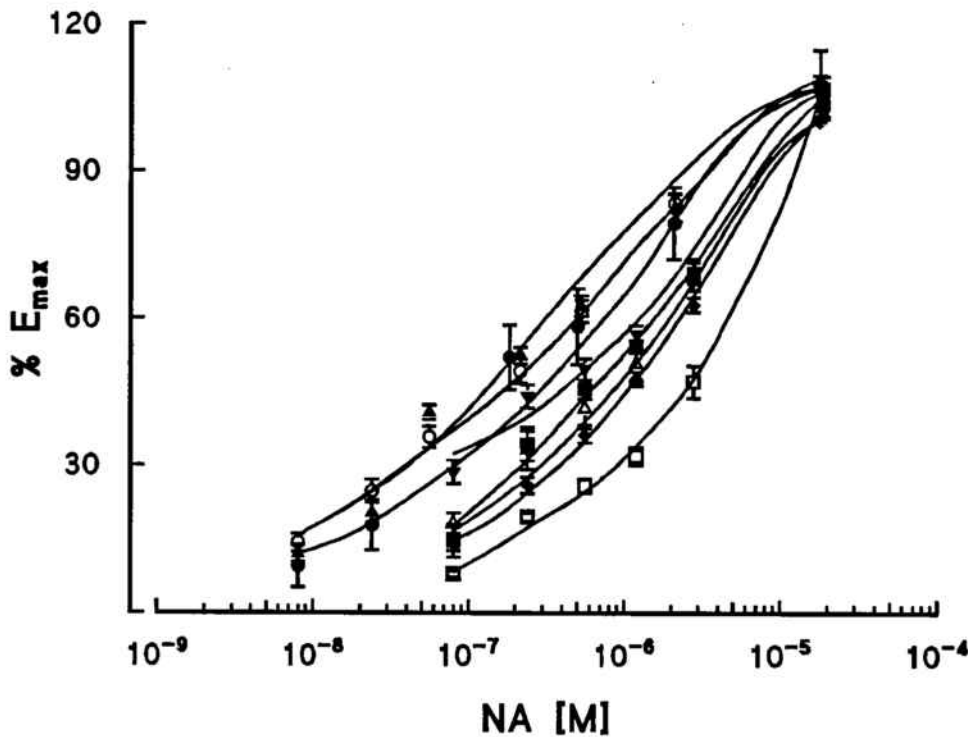


Figura 17.- Curvas concentración-respuesta a NA en presencia de 1 μ M de los diferentes compuestos ensayados: ◆ Control; ▲ PCP; ○ TCP; ● MK-801; ■ dextrorfano; Δ dextrometorfano, □ haloperidol y ▼ (+)-3-PPP.

Curvas concentración-efecto.

En todas las curvas concentración-respuesta a NA en presencia de los diferentes compuestos probados, se observó que la potenciación de la respuesta era mayor a concentraciones bajas de NA. De acuerdo con esta observación y a fin de obtener un valor de potencia para comparar estos compuestos, se calculó la CE_{100} (tabla XIV) para cada uno de ellos, que corresponde a la concentración necesaria para inducir una potenciación del 100 % de la respuesta a una concentración de NA de $0,2 \mu\text{M}$. En la tabla, también se hace constar el coeficiente de correlación (r) obtenido de la regresión lineal de los datos obtenidos, a partir de la cual se ha calculado la CE_{100} .

El orden de potencias obtenido de este modo resultó:

PCP > TCP > (+)-3-PPP > MK-801 > Dextrorfanano

De esta relación se ha excluido el dextrometorfano y el haloperidol, ya que el primero no potenciaba de forma significativa y el segundo inhibía.

TABLA XIV: EFECTO DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS ENSAYADOS EN LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR NA ($0,2 \mu\text{M}$)		
Compuesto	r	CE_{100} (μM)
PCP	0,96	0,63
TCP	0,998	1,86
MK-801	0,96	2,41
DEXTRORFANO	0,96	4,88
DEXTROMETORFANO	--	No potencia
HALOPERIDOL	--	Inhibidor
(+)-3-PPP	0,82	1,99

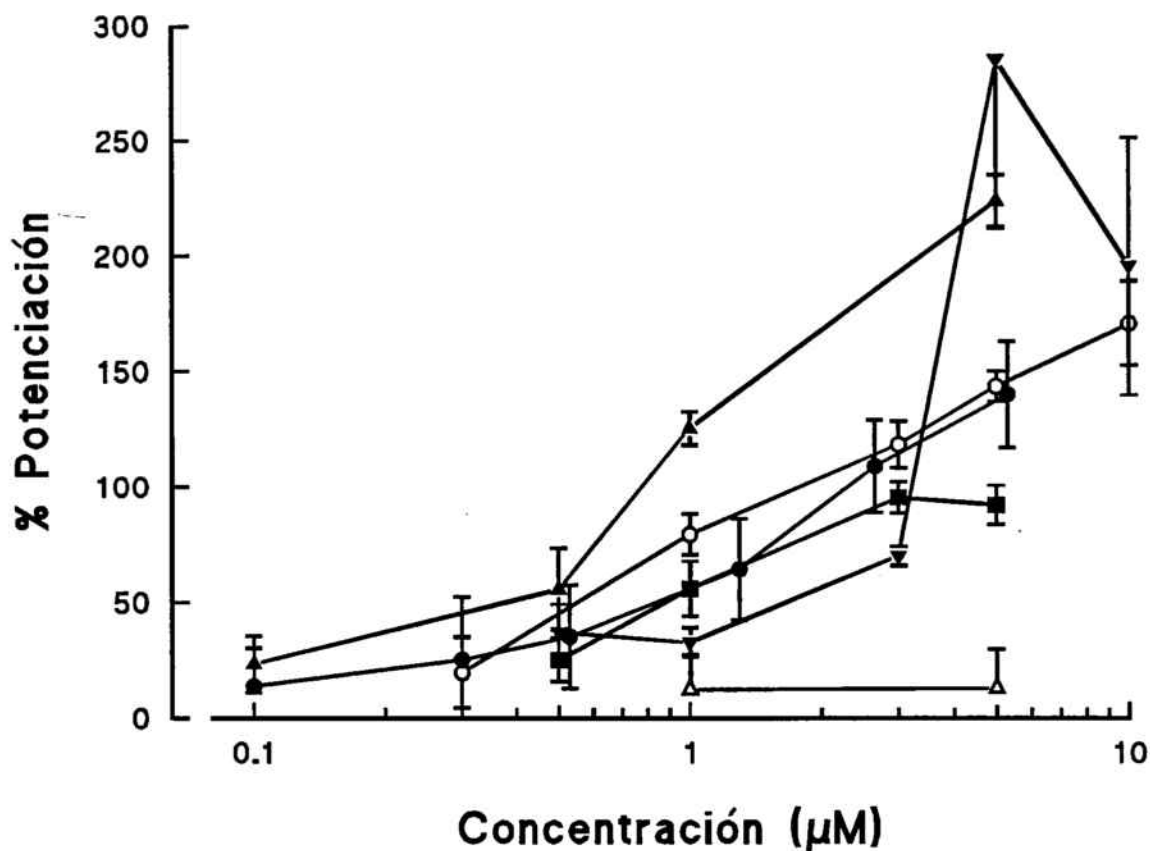


Figura 18.- Representación gráfica de las curvas concentración-efecto (% potenciación) de los compuestos estudiados frente a una concentración de NA de 0,2 µM: ▲ PCP; ○ TCP; ● MK-801; ■ dextrofanano; Δ dextrometorfano y ▼(+)-3-PPP.

2.- ENSAYOS DE UNIÓN CON [³H]NISOXETINA.

Los ensayos de unión a la preparación de membranas de conducto deferente de rata utilizando [³H]nisoxetina como radioligando nos ha permitido caracterizar la unión de dicho radioligando a este tejido, que no estaba descrita previamente y, a partir de aquí, evaluar el efecto de los ligandos σ y PCP escogidos sobre dicha unión.

2.1.- Influencia del sodio.

La unión de la [³H]nisoxetina y otros marcadores del transportador de noradrenalina es, en los tejidos en los que se ha determinado, altamente dependiente de la concentración del catión Na⁺ en el medio. En nuestra preparación de membranas de conducto deferente de rata, la unión específica de este radioligando resultó ser altamente dependiente de la concentración de este catión en el medio de incubación, tal y como demuestran los experimentos realizados a diferentes concentraciones del mismo (Fig. 1). La unión inespecífica, sin embargo, no se vio modificada por la variación en la concentración de dicho catión. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

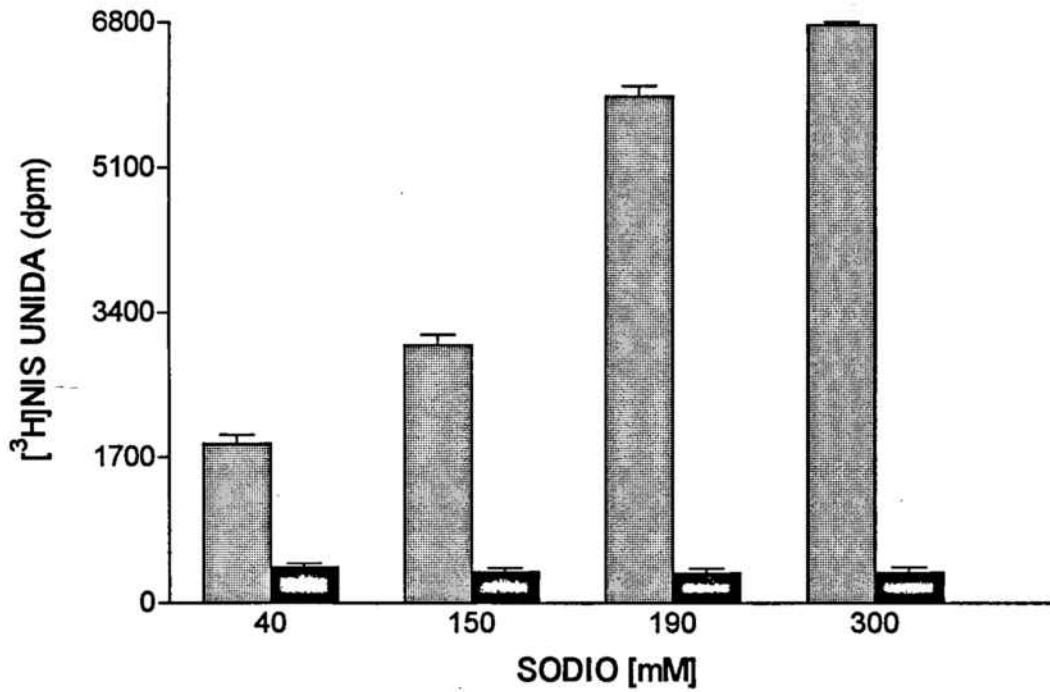


Figura 19.- Influencia de la concentración de Na^+ en la unión específica de la $[^3\text{H}]$ nisoxetina. La unión específica se muestra en barras grises, mientras que la inespecífica se representa con barras negras. Los resultados son la media de tres experimentos realizados por duplicado \pm EEM.

2.2.- Ensayos de saturación.

Tal y como se ha comentado en el apartado de métodos, dichos experimentos permiten obtener la afinidad del radioligando por el receptor (K_D), así como la densidad máxima de lugares de unión (B_{max}).

En estos ensayos, el intervalo de concentraciones de $[^3\text{H}]$ nisoxetina utilizado ha estado comprendido entre 0,1 y 8 nM. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación:

TABLA XV: EVOLUCIÓN DE LA UNIÓN ESPECÍFICA DE LA [3H]NISOXETINA EN FUNCIÓN DE SU CONCENTRACIÓN, EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA	
Concentración de [3H]nisoxetina (nM)	Unión específica (fmoles/mg)
0,1	68,06 ± 11,54
0,25	158,79 ± 28,84
0,5	311,62 ± 57,26
1	570,70 ± 120,4
2	896,24 ± 195,64
5	1324,18 ± 257
8	1529,92 ± 254,48

Los resultados son la media de 5 experimentos realizados por duplicado ± EEM.

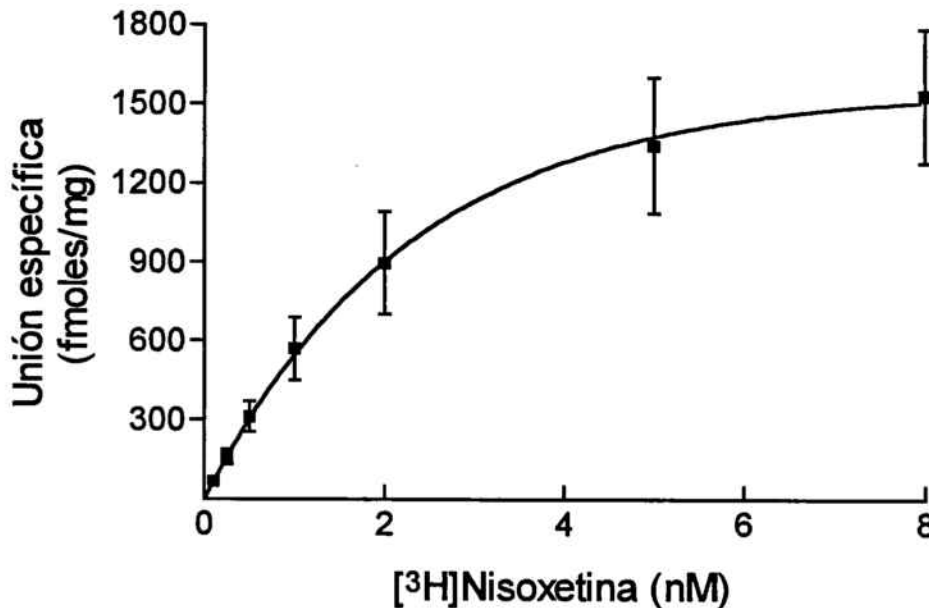


Figura 20.- Saturación de la unión específica de la [3H]nisoxetina en conducto deferente de rata.

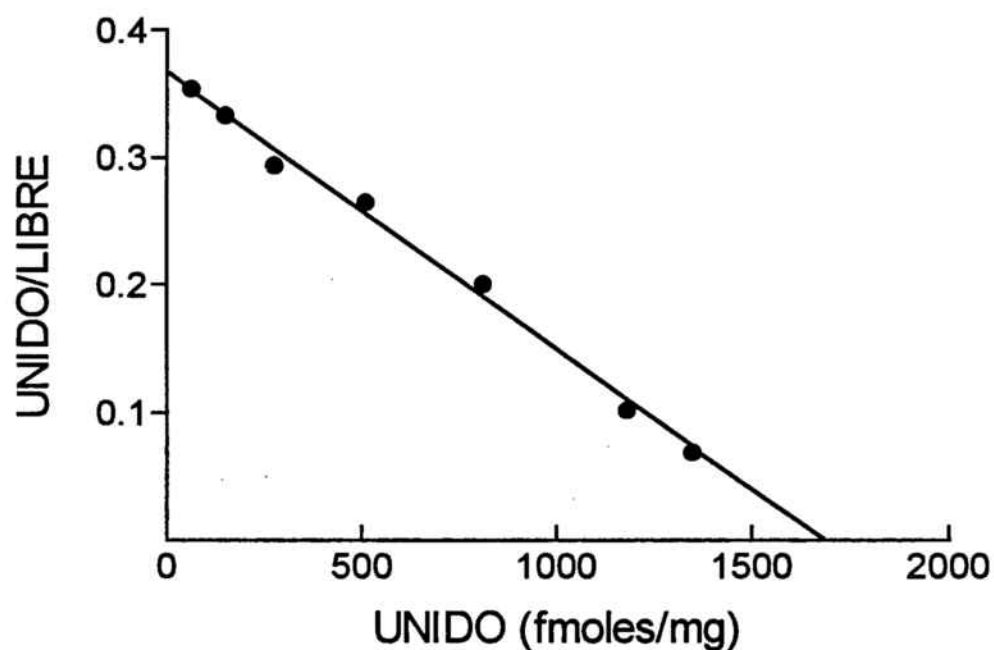


Figura 21.- Representación de Scatchard de la saturación de la unión específica de la [³H]nisoxetina en conducto deferente de rata.

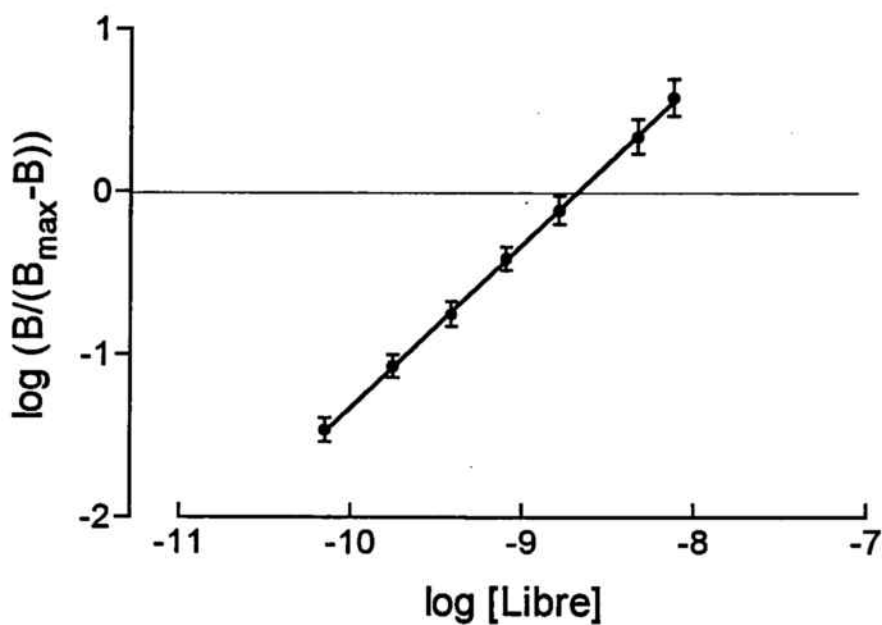


Figura 22.- Representación de Hill de la anterior saturación.

Como se puede observar, la representación de Scatchard de los datos experimentales de la saturación se ajusta a una única recta de regresión, lo cual indica que nos encontramos frente a una única población de lugares de unión, con una densidad máxima de los mismos (B_{max}) que corresponde con la intersección de la recta con el eje de abscisas y que, aproximadamente, presenta un valor de 1.895 fmoles/mg. (figura 21).

El tratamiento de los datos experimentales mediante el programa de regresión no lineal LIGAND confirma los datos anteriores, proporcionando un valor de K_D de $1,63 \pm 0,366$ nM y una B_{max} de 1.625 ± 500 fmoles/mg de proteína. El coeficiente de Hill resultó ser $1,003 \pm 0,017$ y, por lo tanto, corrobora la existencia de una única población de lugares de unión. Todos estos resultados se resumen en la siguiente tabla:

TABLA XVI: RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE SATURACIÓN CON [³H]NISOXETINA EN MEMBRANAS DE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA		
K_D (nM)	B_{max} (fmoles/mg)	n_H
$1,63 \pm 0,36$	1.625 ± 500	$1,003 \pm 0,017$

Los resultados son la media de 5 experimentos \pm EEM.

2.3.- Ensayos cinéticos.

Ensayos de asociación.

La incubación de la [³H]nisoxetina a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60, 120, 180 y 210 min.) nos permite determinar los parámetros cinéticos de asociación de la formación del complejo radioligando-receptor, los cuales se muestran en la tabla XVII. Tal y como se puede observar, el equilibrio no se alcanza hasta cerca de las tres horas de incubación. El tratamiento informático de los resultados mediante el programa KINETIC proporcionó una K_{obs} de $0,044 \pm 0,021$ min.⁻¹ y que, junto al valor de K_i proporcionado por los ensayos de disociación (ver apartado siguiente) permitió calcular el valor de la constante de asociación (K_{+1}) que resultó ser de $5,62 \pm 0,94 \cdot 10^7$ M⁻¹.

En la siguiente tabla se muestra la evolución de la unión específica de la [³H]nisoxetina en función del tiempo de incubación:

TABLA XVII: ENSAYOS CINÉTICOS DE ASOCIACIÓN CON [³H]NISOXETINA	
Tiempo (min.)	Unión específica (%)
5	25,51 ± 3,41
15	58,16 ± 5,43
30	81,91 ± 4,25
60	96,36 ± 1,36
120	99,83 ± 0,08
180	99,99 ± 0
210	99,993 ± 0,003

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por duplicado ± EEM.

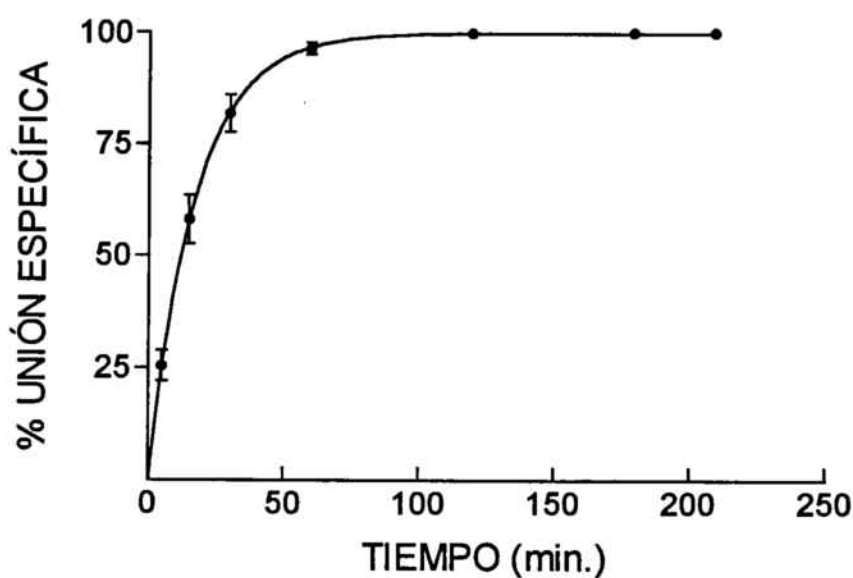


Figura 23.- Cinética de asociación de la [³H]nisoxetina en conducto deferente de rata.

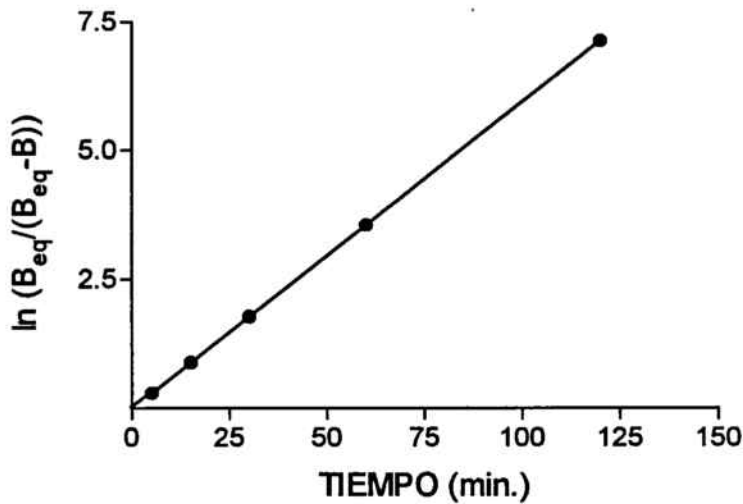


Figura 24.- Representación semilogarítmica de la cinética de asociación en conducto deferente de rata utilizando [³H]nisoxetina como radioligando.

Ensayos de disociación.

Estos ensayos permiten calcular las constantes cinéticas de disociación del radioligando de su lugar de unión. Una vez alcanzado el equilibrio, tras 3 horas de incubación, se añadió a cada tubo 10 μ l de una disolución de desipramina a una concentración tal que la concentración final era 100 μ M. A partir de este momento comenzaba a contar el tiempo de disociación. El tratamiento informático de los resultados con el programa KINETIC proporcionó un valor de K_d de $0,005 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ ($n = 2$).

En la página siguiente se muestran las representaciones gráficas de dichas cinéticas (fig. 25 y 26).

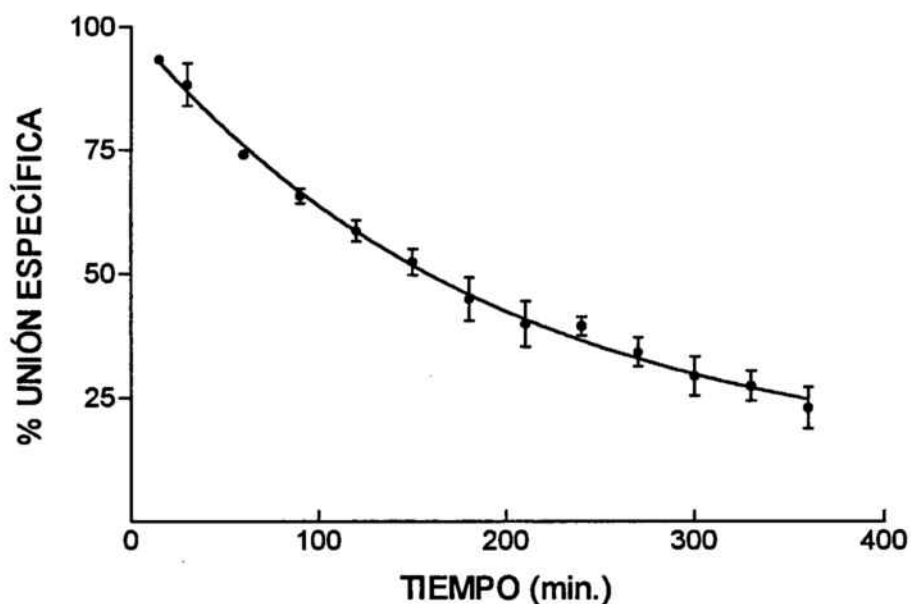


Figura 25.- Cinética de disociación de la [³H]nisoxetina en membranas de conducto deferente de rata.

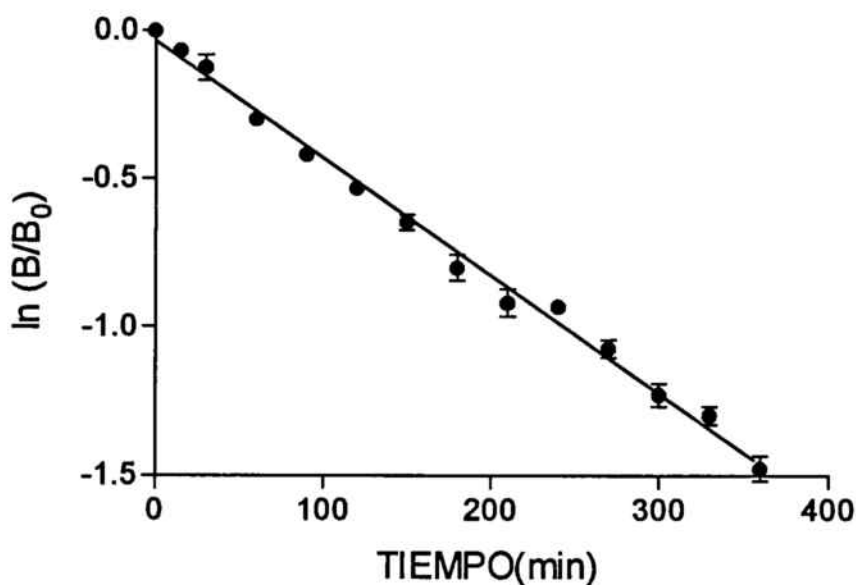


Figura 26.- Representación semilogarítmica de la cinética de disociación en conducto deferente de rata utilizando [³H]nisoxetina como radioligando.

El cociente de k_{-1}/k_{+1} proporciona la constante de disociación cinética K_D , que resultó ser de 0,13 nM el cual es del mismo orden que la obtenida en los ensayos de saturación.

En la siguiente tabla se resumen las constantes cinéticas halladas para la unión de la a membranas de conducto deferente de rata:

TABLA XVIII: CONSTANTES CINÉTICAS DE LA UNIÓN DE LA [3H]NISOXETINA EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA			
$K_{obs} (min^{-1})$	$K_{-1} (min^{-1})$	$K_{+1} (min^{-1}M^{-1})$	$K_D (nM)$
0,044 ± 0,021	0,0042 ± 0,0014	5,616 ± 0,939 · 10 ⁷	0,13

2.4.- Ensayos de competición.

A fin de determinar la interacción de los ligandos σ y PCP con el transportador de noradrenalina en conducto deferente de rata se han realizado ensayos donde se comparan las potencias de los mismos para inhibir la unión de un marcador de dicho transportador como es la [3H]nisoxetina.

Los parámetros que nos proporcionan estos ensayos son la K_i , que tal y como se ha descrito indica la afinidad de la sustancia competidora por el receptor, y la CI_{50} (concentración inhibitoria 50 %), que es la concentración de inhibidor capaz de producir una inhibición del 50 % en la unión del radioligando. Además, la pendiente de la transformación de Hill de cada competición (n_H) nos da una idea de la competitividad del desplazamiento si ésta no difiere de la unidad.

Todos los compuestos ensayados desplazaron completamente la unión de la [3H]nisoxetina a la máxima concentración probada. Todos presentaron valores de K_i y CI_{50} de orden micromolar. La similitud de ambas constantes en cada uno de los compuestos, unida al coeficiente de Hill de 1 (excepto el (+)-3-PPP, que difiere con $P < 0,05$), permite deducir que se trata de un desplazamiento de tipo competitivo. Los resultados de los experimentos realizados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA XIX : INHIBICIÓN DE LA UNIÓN ESPECÍFICA DE LA [³H]NISOXETINA EN MEMBRANAS DE CONDUCTO DEFERENTE DE RATA POR DIFERENTES LIGANDOS σ Y PCP			
COMPUESTO	K _i (μM)	CI ₅₀ (μM)	n _H
MK-801	9,18 ± 1,28	7,10 ± 0,83	1,03 ± 0,04
Dextrorfano	8,60 ± 2,42	7,25 ± 2,34	1,10 ± 0,05
Fenciclidina	17,40 ± 1,93	12,1 ± 0,85	1,06 ± 0,03
Tenociclidina	24,7 ± 6,03	17,34 ± 3,40	1,00 ± 0,04
Haloperidol	3,52 ± 0,96	2,43 ± 0,34	1,00 ± 0,3
Dextrometorfano	8,19 ± 1,06	6,25 ± 1,05	1,06 ± 0,04
(+)-3-PPP*	--	7,50 ± 0,58	0,73 ± 0,06

(*) (+)-3-PPP = (R)-(+)-3-(3-hidroxifenil)-N-propilpiperidina

Los resultados son la media de 3 o más experimentos realizados por duplicado ± EEM.

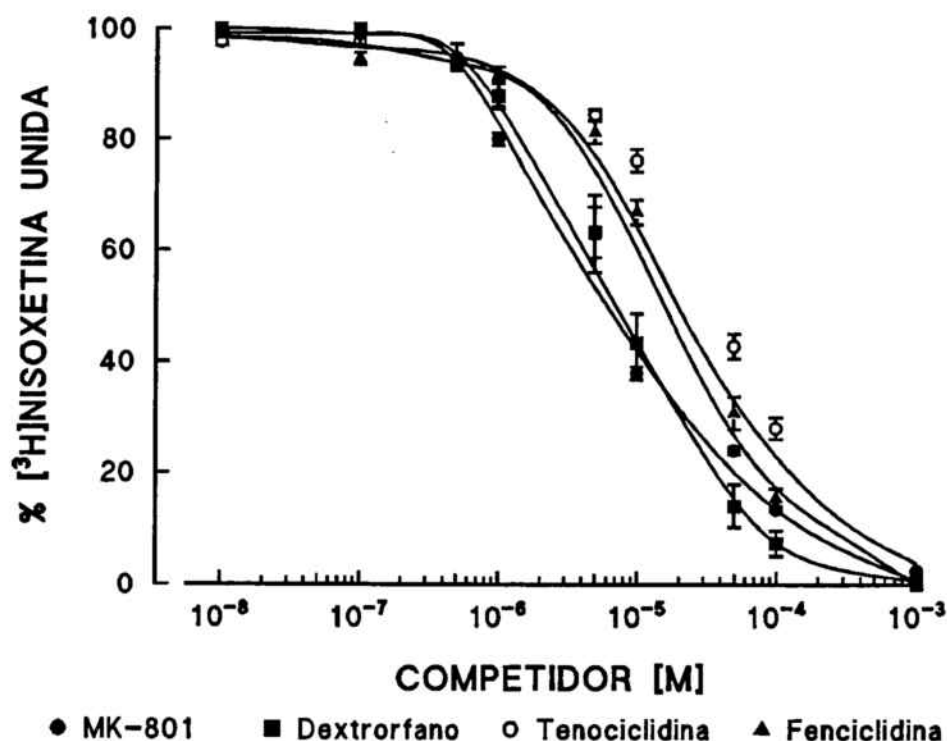


Figura 27.- Inhibición de la unión de la [³H]nisoxetina por diversos ligandos de tipo PCP en membranas de conducto deferente de rata.

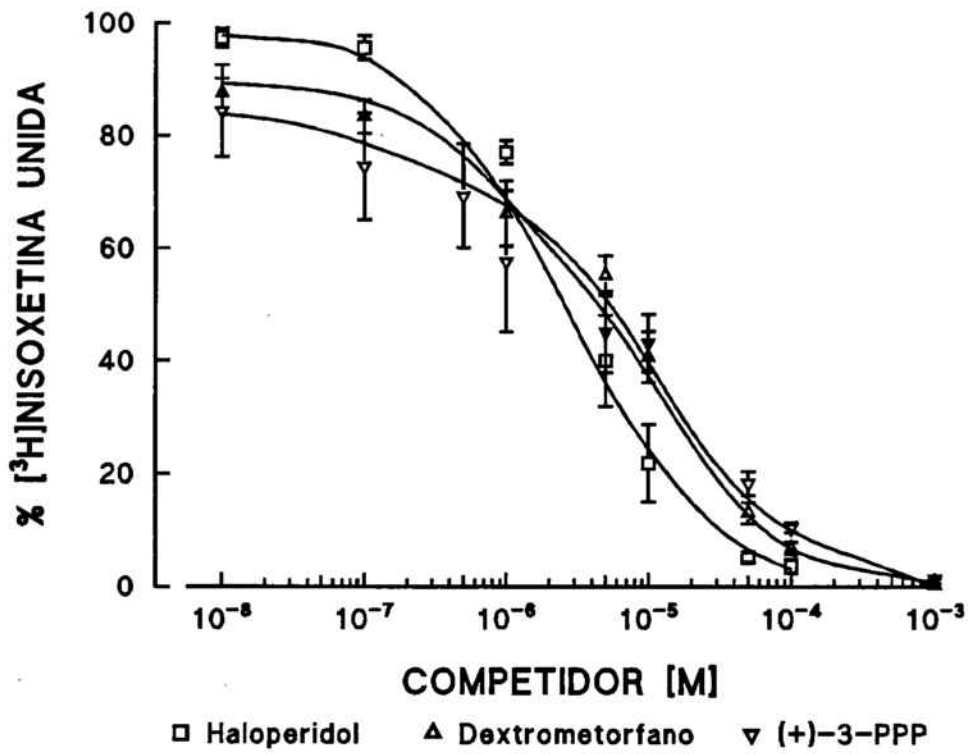


Figura 28.- Inhibición de la unión de la $[^3\text{H}]$ nisoxetina por diversos ligandos de tipo σ en membranas de conducto deferente de rata.

3.- CAPTACIÓN DE [³H]NORADRENALINA.

3.1.- Cinética de captación de [³H]noradrenalina en conducto deferente de rata.

Estos experimentos han servido para determinar el tiempo idóneo de incubación para realizar posteriormente los ensayos de inhibición del *uptake*. Para ello se incubaron los conductos deferentes con una concentración de [³H]noradrenalina de 0,1 μ M a diferentes tiempos, determinándose la incorporación a cada uno de los tiempos. Los resultados se muestran a continuación:

TABLA XX: CINÉTICA DE INCORPORACIÓN DE LA [³H]NORADRENALINA EN LA PORCIÓN EPIDIDIMAL DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA	
Tiempo (min.)	[³H]noradrenalina incorporada (fmoles/mg)
1	49,08 \pm 0,61
3	120,70 \pm 4,08
5	225,38 \pm 39,31
10	393,45 \pm 24,29
20	749,10 \pm 24,11
30	981,22 \pm 6,81

Los resultados son la media de dos experimentos realizados por duplicado \pm EEM.

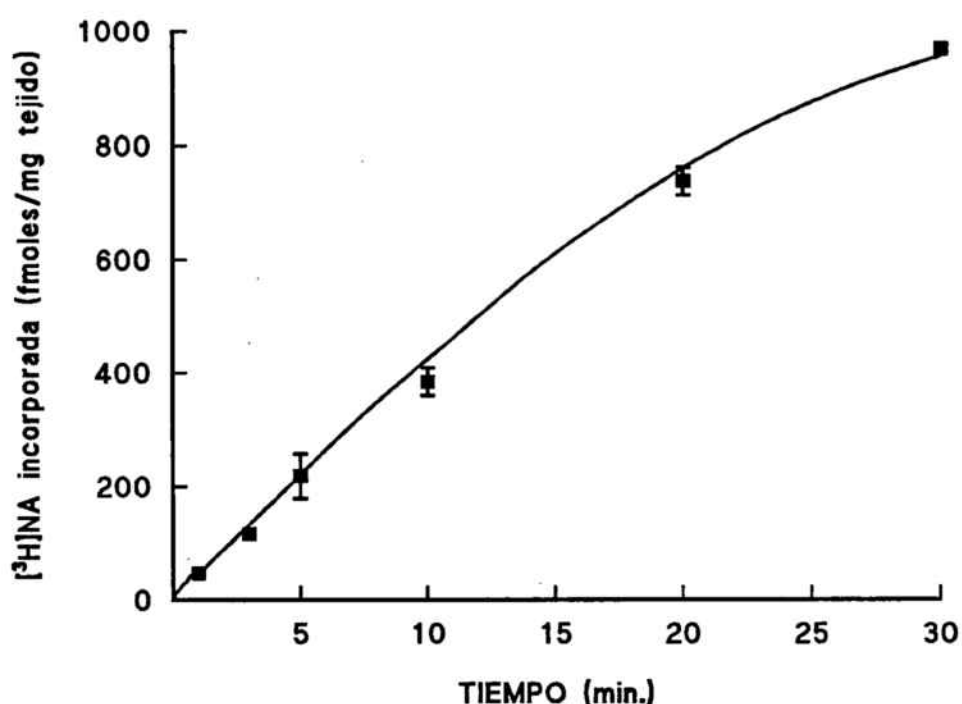


Figura 29.- Representación gráfica de la cinética de captación de [³H]noradrenalina en la parte epididimal del conducto deferente de rata.

Como se puede observar, la incorporación de la [³H]noradrenalina ha resultado ser lineal en función del tiempo, sobretodo en los primeros 10 minutos de incubación. Estos datos, junto a los proporcionados en otras referencias bibliográficas nos ha permitido establecer el tiempo de incubación de los tejidos con el neurotransmisor marcado en 3 minutos.

3.2.- Inhibición de la captación de la [³H]noradrenalina por ligandos sigma y PCP.

Para determinar el efecto de los ligandos σ y PCP sobre la captación de [³H]noradrenalina en la porción epididimal del conducto deferente de rata se preincubaron los órganos con el compuesto durante 10 min., tal y como se ha explicado en el apartado de métodos. El parámetro que obtenemos de estos ensayos es la CI₅₀. Los

porcentajes de incorporación a cada concentración de compuesto se muestran en las siguientes tablas, así como su representación gráfica:

MK-801	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCORPORACIÓN
0,1	76,26
1	67,6 ± 4
3	54,9 ± 0,38
5	46,66 ± 3,8
10	41,84 ± 3,74
30	33,9 ± 2,7
50	29,13 ± 1,87

DEXTRORFANO	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCORPORACIÓN
0,1	88,06
1	86,9 ± 3,18
3	72,73 ± 3,97
10	56,93 ± 5,98
30	46,50 ± 6,28
100	32,32 ± 3,19

FENCICLIDINA	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCORPORACIÓN
0,1	81,53
1	72,90 ± 4,95
3	62,90 ± 3,96
10	40,20 ± 3,22
30	28,60 ± 3,67
100	19,55 ± 1,95

TENOCICLIDINA	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCOPORACIÓN
0,1	100
1	100 ± 6,12
3	88,33 ± 6,35
10	73,68 ± 3,06
30	44,92 ± 2,74
100	30,55 ± 2,09

Tabla XXI.- Inhibición de la captación de [³H]noradrenalina por ligandos de tipo PCP. Los resultados son la media de tres o más experimentos realizados por duplicado ± EEM.

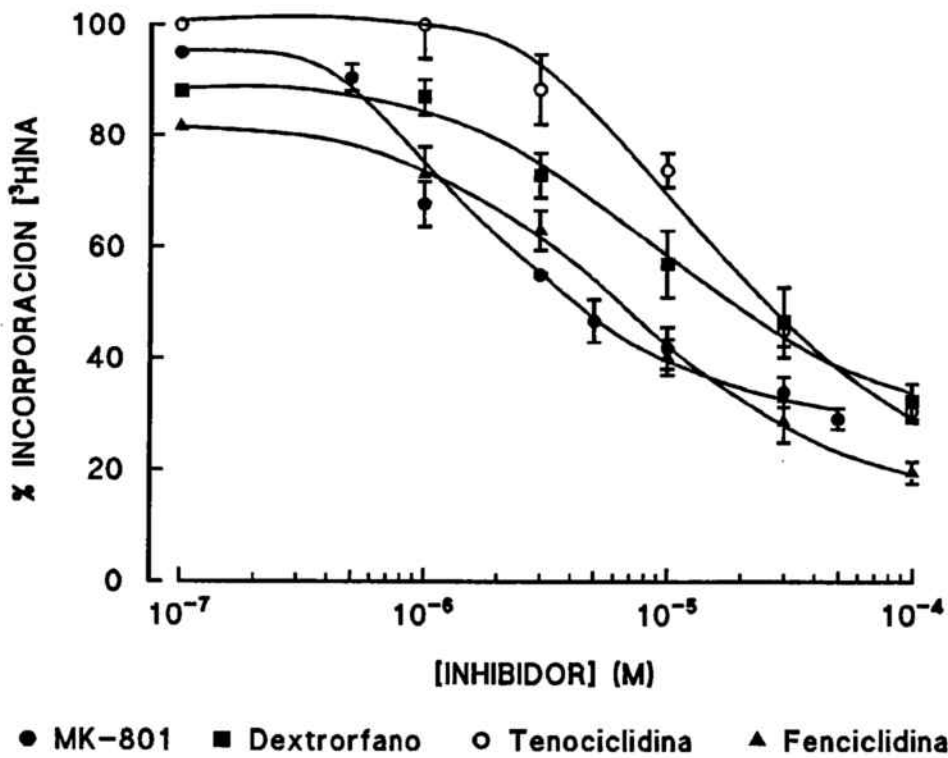


Figura 30.- Curvas de inhibición de la captación de [³H]noradrenalina por ligandos de tipo PCP en conducto deferente de rata.

HALOPERIDOL	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCOPORACIÓN
0,1	80,7
1	75,43 \pm 3,44
3	70,35 \pm 3,50
10	55,95 \pm 3,79
30	45,92 \pm 2,27
100	40,24 \pm 2,53

DEXTROMETORFANO	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCOPORACIÓN
0,1	85,3
1	87,35 \pm 5,86
3	73,47 \pm 4,39
10	55,18 \pm 7,15
30	44,30 \pm 2,84
100	23,75 \pm 1,44

(+) -3-PPP	
CONCENTRACIÓN (μM)	% INCOPORACIÓN
0,1	100
1	99,85 \pm 2,71
3	84,07 \pm 10,32
10	57,55 \pm 5,69
30	36,50 \pm 1,11
100	24,25 \pm 2,93

Tabla XXII.- Inhibición de la captación de [^3H]noradrenalina por ligandos de tipo σ . Los resultados son la media de tres o más experimentos realizados por duplicado \pm EEM.

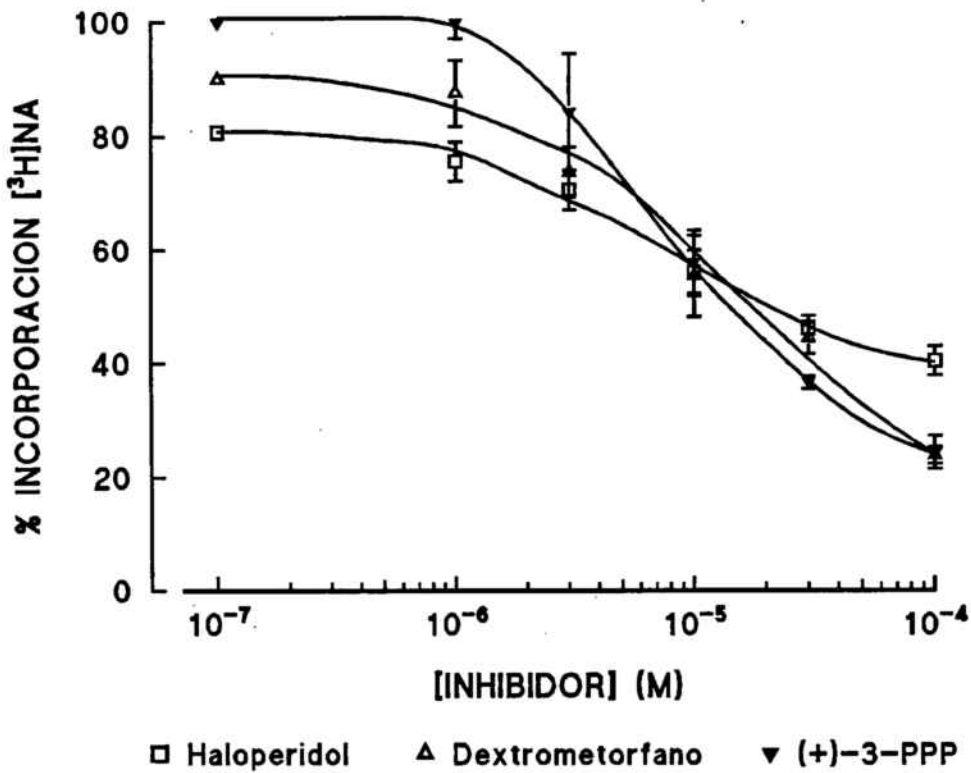


Figura 31.- Curvas de inhibición de la captación de [3H]noradrenalina por ligandos de tipo σ en conducto deferente de rata.

El tratamiento informático de estos datos mediante regresión no lineal (programa GraphPAD InPlot) proporcionó los valores de CI_{50} , que se muestran a continuación:

COMPUESTO	CI_{50} (μ M)
<i>Ligandos PCP</i>	
MK-801	$1,79 \pm 0,06$
DEXTRORFANO	$1,09 \pm 0,04$
FENCICLIDINA	$6,38 \pm 0,11$
TENICLIDINA	$15,20 \pm 0,30$
<i>Ligandos σ</i>	
HALOPERIDOL	$7,83 \pm 0,10$
DEXTROMETORFANO	$18,1 \pm 0,80$
(+)-3-PPP	$7,46 \pm 0,007$

Tabla XXIII.- CI_{50} de los ligandos sigma y PCP estudiados en los ensayos de captación de [3H]noradrenalina.

4.-EXPERIMENTOS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL CON MK-801.

4.1.- Rata normal.

4.1.a.- Rata no pretratada.

La administración endovenosa de MK-801 a la rata anestesiada con pentobarbital, a dosis comprendidas entre 0,05 y 0,3 mg/kg produjo un incremento de la presión arterial dosis-dependiente, obteniéndose el mayor incremento a la mayor dosis administrada. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA XXIII: INCREMENTOS NETOS DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR EL MK-801 (iv) EN RATA NORMAL		
Dosis de MK-801 (mg/kg)	Incremento de presión (mm Hg)	n
0,05	2,00 ± 0,94	3
0,1	7,60 ± 2,14	5
0,15	7,89 ± 0,74	9
0,2	6,44 ± 1,03	9
0,3	9,83 ± 1,70	6

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes.

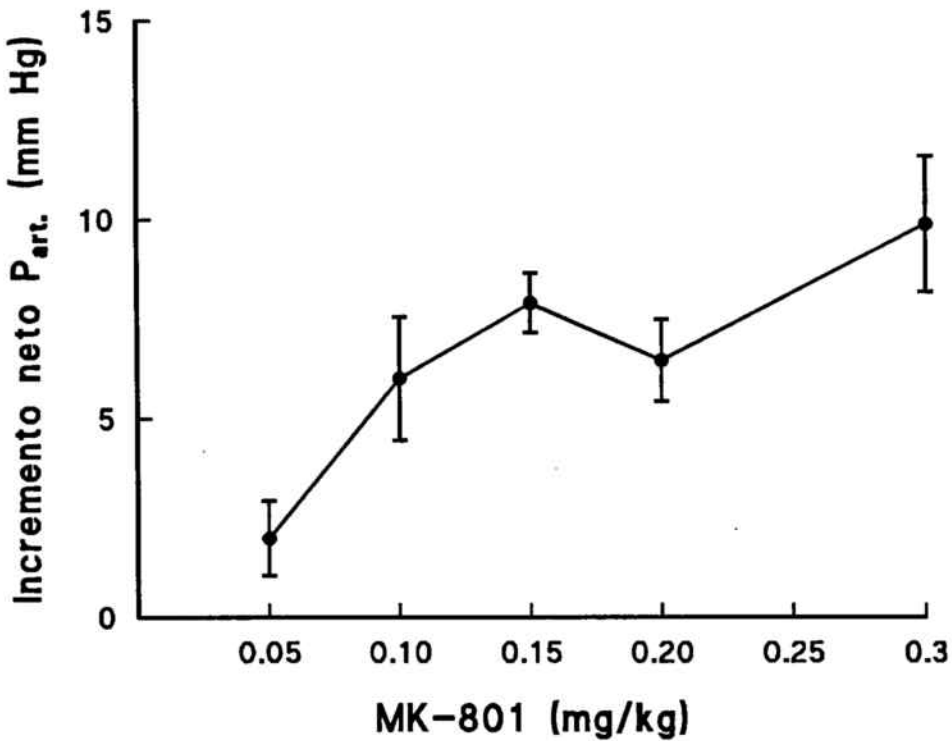


Figura 32.- Curva dosis-respuesta que representa los incrementos netos de presión arterial provocados por diferentes dosis de MK-801 (iv) en la rata anestesiada.

El incremento de presión arterial se mantenía durante 45-60 segundos, después de los cuales se producía una caída de presión por debajo del nivel basal que se acompañaba de bradicardia (fig. 33). Seguidamente, se observaba una recuperación de la presión aunque ésta no llegaba a los valores iniciales. La caída de presión fue directamente proporcional a la dosis administrada. A dosis mayores de 0,3 mg/kg se requería respiración asistida para que el animal pudiera superar la marcada hipotensión.

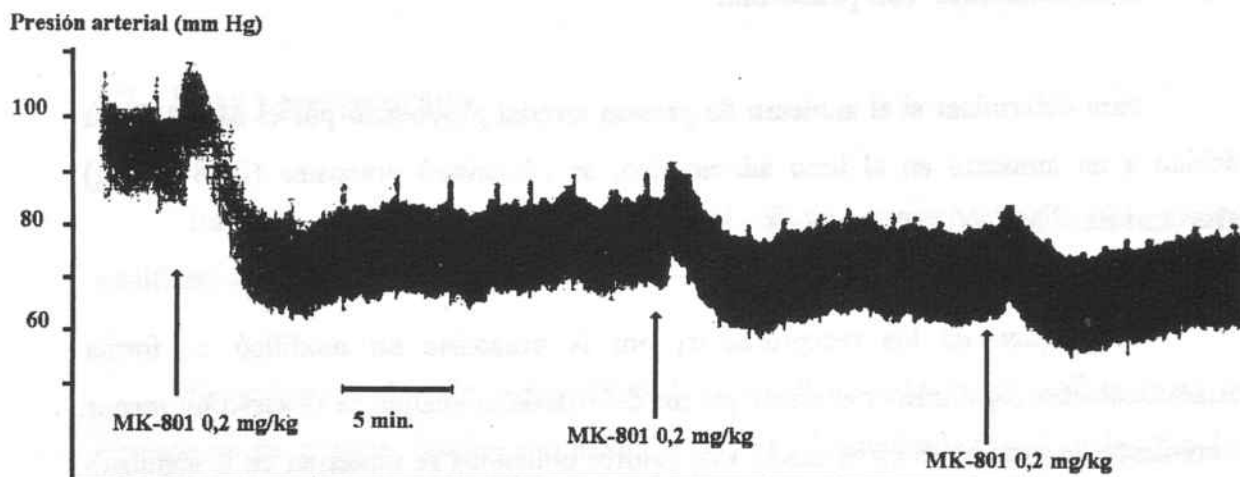


Figura 33.- Ejemplo de registro de presión arterial en la rata anestesiada y de los incrementos de la misma provocados por la administración repetida de MK-801 a una determinada dosis. Las flechas indican el momento de las administraciones.

4.1.b.- Efecto en ratas vagotomizadas.

Cuando a la rata se le practicaba una vagotomía bilateral, el efecto provocado por la administración de MK-801 (0,1 mg/kg) sobre la presión arterial no se veía modificado de forma significativa. Se observaba tanto el incremento de presión inicial como la bajada subsiguiente.

TABLA XXIV: INCREMENTOS NETOS DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR EL MK-801 (0,1 mg/kg, iv) EN RATA NORMAL Y VAGOTOMIZADA

RATA	Incremento de presión (mm Hg)	n	Significación
NORMAL	7,60 ± 2,14	5	ns, $P > 0,5$
VAGOTOMIZADA	5,67 ± 0,33	3	

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada mediante ANOVA: ns, no significativo.

4.1.c.- Pretratamiento con prazosina.

Para determinar si el aumento de presión arterial provocado por el MK-801 era debido a un aumento en el tono adrenérgico, se administró prazosina (0,08 mg/kg) previamente al MK-801 (0,3 mg/kg).

El bloqueo de los receptores α_1 por la prazosina no modificó de forma estadísticamente significativa el efecto presor del MK-801, aunque se observó un menor incremento de presión en estos casos. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA XXV: INCREMENTOS NETOS DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR EL MK-801 (iv) EN PRESENCIA DE PRAZOSINA (PRZ)			
Tratamiento	Incremento de presión (mm Hg)	n	Significación
MK-801 (0,3 mg/kg)	9,83 ± 1,70	6	ns, $P > 0,05$
PRZ (0,08 mg/kg) + MK-801 (0,3 mg/kg)	7,00 ± 0,57 ^{ns}	4	

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada mediante ANOVA: ns, no significativo.

4.1.d.- Pretratamiento con propranolol.

Bloqueando los receptores β con propranolol, a dosis entre 1 y 5 mg/kg y administrando a continuación el MK-801 (0,3 mg/kg), se producía un incremento similar de la presión arterial, pero el animal era incapaz de superar la posterior caída de presión y moría.

4.2.- Rata reserpinizada.

En ratas pretratadas con reserpina, el efecto presor del MK-801 resultó significativamente menor frente al producido en ratas no reserpinizadas (tabla XXVI).

Se ensayaron dos dosis de MK-801: 0,2 y 0,3 mg/kg, y en ambos casos el incremento de presión resultó ser menor en ratas reserpinizadas, indicando que los niveles de NA almacenada en las vesículas sinápticas son determinantes en el efecto presor del MK-801.

TABLA XXVI: INCREMENTOS NETOS DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR EL MK-801 (iv) EN RATA NORMAL Y RESERPINIZADA			
Tratamiento	Incremento de presión (mm Hg)	n	Significación
- MK-801 (0,2 mg/kg), rata normal.	6,44 ± 1,03	9	<i>P</i> < 0,05
-MK-801 (0,2 mg/kg), rata reserpinizada.	2,60 ± 0,40	5	
- MK-801 (0,3 mg/kg), rata normal.	9,83 ± 1,70	6	<i>P</i> < 0,05
-MK-801 (0,3 mg/kg), rata reserpinizada.	6,25 ± 0,63	4	

Los resultados se expresan como la media ± EEM de “n” experimentos diferentes. Comparación realizada mediante ANOVA.

4.3.- Rata desmedulada.

4.3.a.- Efecto del MK-801.

En la preparación de rata desmedulada, la presión arterial basal bajaba desde $148,17 \pm 5,58$ mm Hg hasta $54,8 \pm 3,4$ mm Hg, ($P < 0,0001$) tal como está descrito, al perderse el control central.

La administración de MK-801 (0,3 mg/kg) inducía en estos animales un aumento neto de $2,45 \pm 0,34$ mm Hg ($P < 0,005$) (tabla XXVII) que, sin embargo, no iba acompañado de la subsiguiente caída por debajo de la presión basal que se observaba en rata normal (fig. 34).

TABLA XXVII: INCREMENTOS DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR EL MK-801 (iv) EN RATA DESMEDULADA

Tratamiento	Incremento de presión (mm Hg)	n	Significación
Suero fisiológico(1 ml/kg)	$1,4 \pm 0,24$	5	$P < 0,005$
MK-801 (0,3 mg/kg)	$3,9 \pm 0,39$	11	

Los resultados se expresan como la media \pm EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada mediante ANOVA.

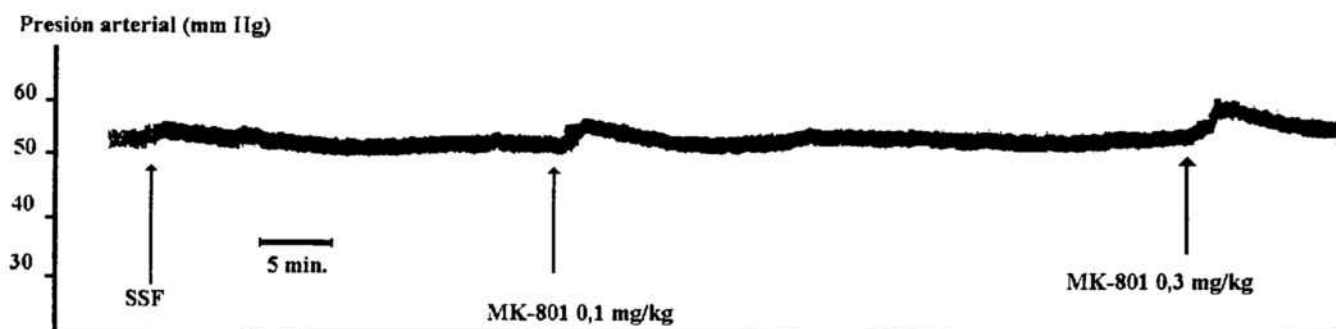


Figura 34.- Ejemplo del registro de presión obtenido en la rata desmedulada y de los incrementos de presión provocados por el suero fisiológico (SSF) y por el MK-801 a dos dosis diferentes.

Dado que está descrito que el efecto hipotensor o hipertensor de una determinada sustancia depende de la presión arterial basal inicial, y que la presión arterial de la rata desmedulada es muy inferior a la de la normal, se expresaron los resultados como porcentaje de incremento de presión respecto a la presión basal. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA XXVIII: COMPARATIVA DE LOS % DE INCREMENTO DE PRESIÓN ARTERIAL PROVOCADOS POR LA ADMINISTRACIÓN DE MK-801 (0,3 mg/kg) EN LA RATA NORMAL Y DESMEDULADA					
RATA	Presión arterial basal	Incremento neto de presión (mm Hg)	Incremento en %	n	Significación
NORMAL	148,17 ± 5,58	9,83 ± 1,70	6,60 ± 1,2	12	ns, $P > 0,1$
DESMEDULADA	54,18 ± 3,38	2,46 ± 0,34	4,54 ± 0,63	11	

Los resultados se expresan como la media ± EEM de "n" experimentos diferentes. Comparación realizada mediante ANOVA. ns: diferencia no significativa.

Por lo tanto, los incrementos de presión arterial provocados por el MK-801 son del mismo orden en rata normal que en rata desmedulada.

4.3.b.- Potenciación del efecto presor de la noradrenalina.

El MK-801, a una dosis de 0,3 mg/kg, consiguió potenciar un 39,6 % ± 9,8 % (n = 3, $P < 0,05$) el efecto presor de la noradrenalina (0,17 µg/kg) en rata desmedulada. En la siguiente figura (página siguiente) se muestra el registro de presión correspondiente a uno de los experimentos.



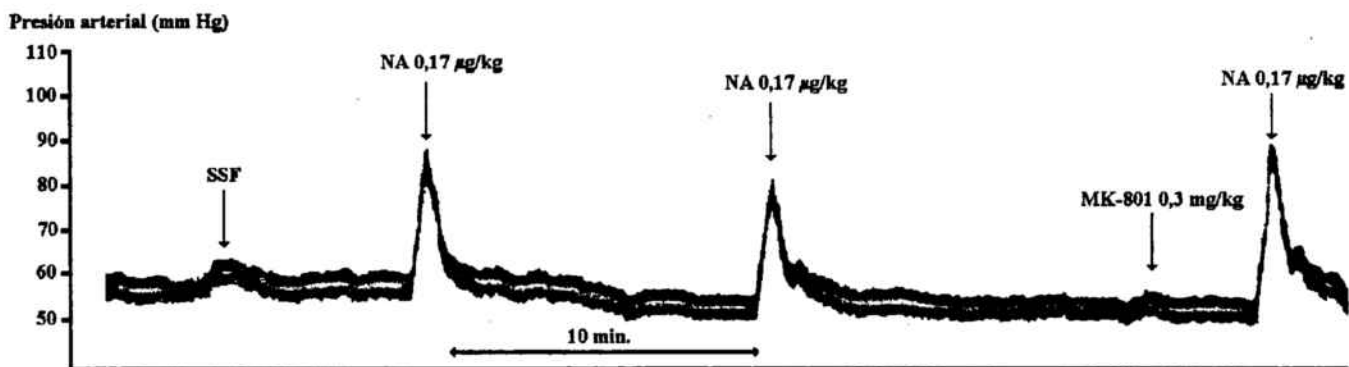


Figura 35.- Ejemplo de registro de la potenciación del efecto presor de la NA (0,17 µg/kg) por MK-801 (0,3 mg/kg) en rata desmedulada.

III.- DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

a) EFECTOS EN ÓRGANO AISLADO.

En el presente trabajo se estudió primeramente el efecto del MK-801 (dizocilpino) sobre la actividad contráctil de la porción epididimal aislada del conducto deferente de rata. Este efecto consiste en una potenciación concentración-dependiente de las respuestas a NA, tanto exógena como neurogénica (por estimulación eléctrica), así como la inducción muy marcada de actividad espontánea en la preparación cuando éste es adicionado solo. Las curvas concentración-respuesta a noradrenalina (NA) en presencia de crecientes concentraciones de MK-801 se desplazan hacia la izquierda y las CE_{50} para la NA disminuyen, indicando una potenciación.

Los efectos potenciadores de las respuestas a NA por este compuesto sólo habían sido descritas en arteria caudal de rata aislada y perfundida (Massamiri y Duckles, 1991), y los experimentos realizados por estas autoras apuntaban a la inhibición de la captación de NA como el mecanismo de acción más probable en ese tejido. Esta hipótesis estaba reforzada por el hecho de que el MK-801 es un buen inhibidor de la captación de [3 H]NA en sinaptosomas de hipocampo de rata (Snell y Johnson, 1988) y en células cromafines bovinas (Rogers y Lemaire, 1991).

A fin de dilucidar el posible mecanismo de acción del MK-801 en nuestra preparación realizamos una serie de experimentos cuyos resultados discutimos seguidamente:

El MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor NMDA que tiene su lugar de unión en el canal iónico acoplado al mismo (Lodge y Johnson, 1990). A pesar de ello, el efecto potenciador sobre la NA no se vio afectado ni revertido por la adición previa del agonista NMDA más su co-agonista glicina. Por otra parte, un antagonista competitivo del receptor NMDA, el AP5, inhibió más que potenció el efecto de la NA (CE_{50} control $0,99 \pm 0,05 \mu\text{M}$, y $1,58 \pm 0,06 \mu\text{M}$ en presencia de AP5 $10 \mu\text{M}$, $P < 0,001$). Además, todos los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de magnesio ($1,2 \text{ mM}$) a la cual el canal iónico asociado al receptor NMDA se encuentra bloqueado. Es más, la potenciación de las contracciones inducidas eléctricamente era mucho mayor en una solución salina que contenía Mg^{2+} . Estos resultados permiten, por lo tanto, descartar la participación de receptores NMDA en este efecto del MK-801.

Finalmente, se descartó también una posible acción sobre la autoliberación de NA modulada por los receptores α_2 presinápticos, ya que el bloqueo de éstos por yohimbina no modificó las respuestas a MK-801 (CE_{50} para la NA con MK-801 $5,3 \mu\text{M}$: $0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ en ausencia y $0,08 \pm 0,04 \mu\text{M}$ en presencia de yohimbina).

Así pues, para explicar estos efectos sólo quedaban dos posibles mecanismos a postular:

- 1.- Que el MK-801 provocara un aumento de la liberación de la NA endógena.
- 2.- Que el MK-801 bloqueara la captación de NA en este órgano, tal y como se había descrito en otros tejidos.

El hecho de que la potenciación de las contracciones inducidas por NA exógena (curvas concentración-respuesta) también existiera en órganos con las reservas de

neurotransmisores depleccionadas (ratas reserpinizadas), permite deducir que no nos encontrábamos ante un aumento de la liberación de NA y apoya la posibilidad de que se trate de una inhibición de la recaptación.

La funcionalidad de la mayoría de transportadores para neurotransmisores, y en concreto el de la NA, es dependiente de sodio (Zeitner y Graefe, 1986; Worrall y Williams, 1994) y, por lo tanto, la supresión o disminución de este catión en el medio reduce su actividad. En nuestros experimentos, la sustitución del NaCl por cloruro de colina en la solución de Krebs-Henseleit impidió la potenciación del efecto de la NA por el MK-801. Aunque el sodio no fue retirado del todo (todavía quedaba 25 mM del NaHCO_3), la importante reducción efectuada y la presencia de colina, que resulta ser sustrato del transportador de NA en conducto deferente de rata (Ungell y col., 1986), permitió alcanzar una inhibición del transporte suficiente para establecer comparaciones con tejidos control (inmersos en solución de Krebs estándar). Por lo tanto, estos resultados apuntan a que el efecto potenciador del MK-801 se debe a una inhibición de la recaptación de la NA, hipótesis que se verá confirmada más adelante con el resto de experimentos.

De este modo, el MK-801 potenciaría el efecto de la NA al inhibir su recaptación, permitiendo que permanezca más tiempo en el espacio sináptico. Por este mismo mecanismo, la adición del MK-801 solo al medio provocaría la aparición de actividad espontánea al evitar la recaptación de la NA que se libera de forma basal. De hecho, la desipramina, que es un potente inhibidor de la captación neuronal de catecolaminas, indujo en nuestra preparación, a una concentración de 0,1 μM , una actividad espontánea del mismo tipo que el MK-801 (resultados no incluidos).

Esta actividad espontánea inducida por el MK-801 desaparecía de inmediato al adicionar prazosina (1 μM) al medio, indicando que está mediada por el receptor adrenérgico α_1 . Por otra parte, esta actividad espontánea no aparece en órganos procedentes de ratas reserpinizadas, lo que lleva a concluir que esta actividad inducida por el MK-801 se debe a la liberación basal de NA de las vesículas sinápticas de las fibras

nerviosas que inervan el tejido que, en condiciones normales, no es capaz de inducir respuesta al ser recaptada con avidez, pero que si está inhibida la recaptación alcanza los niveles necesarios para desencadenarla. La NA liberada espontáneamente y que no puede ser recaptada interaccionaría a continuación con los receptores α_1 postsinápticos y desencadenaría la respuesta. De hecho, cuando los órganos de ratas reserpinizadas se incubaban con NA, recargándose de este modo las reservas del neurotransmisor, la actividad espontánea al añadir el MK-801 se recuperaba. Por otra parte, como ya se ha dicho, la potenciación en las curvas concentración-respuesta a NA no era diferente en órganos procedentes de ratas reserpinizadas respecto a ratas control, por lo que esta potenciación no depende de la NA endógena.

El MK-801 se encuentra dentro de los denominados ligandos PCP que, junto a ciertos ligandos sigma comparten la propiedad de a) inhibir la captación de catecolaminas, especialmente de dopamina en SNC y médula suprarrenal bovina (Rogers y Lemaire, 1991; 1992) y b) potenciar las respuestas a NA en algunos tejidos periféricos como el conducto deferente de ratón (Campbell y col., 1987; Kennedy y Henderson, 1989) y de cobayo (Vaupel y Su., 1987), así como en arteria caudal de rata (Massamiri y Duckless, 1990; 1991).

En conducto deferente de rata, sólo se había estudiado el efecto del PCP (Fox y col., 1989), de la pentazocina, la N-alilnormetazocina y el DTG (Fox y col., 1991), demostrándose que su efecto no era debido a una acción sobre receptores σ . Sin embargo, estos trabajos estaban encaminados a cuestionar la utilidad de este órgano para evaluar potenciales ligandos σ y no a establecer, con un mayor número de compuestos, acciones que pudieran explicar las potenciaciones encontradas.

Así pues, encontramos interesante hacer un estudio comparativo sobre la actividad noradrenérgica con otros ligandos PCP (el propio PCP, el MK-801 ya estudiado, el TCP y el dextrorfano) y σ (haloperidol, dextrometorfano y (+)-3-PPP) en el conducto deferente de rata, ya que es un órgano prototipo para estudiar efectos adrenérgicos. Todos los compuestos ensayados, a excepción del haloperidol que inhibió,

potenciaron en mayor o menor grado las contracciones inducidas por NA exógena, provocando un desplazamiento de las curvas concentración-respuesta a NA hacia la izquierda, de forma concentración-dependiente. A fin de comparar las potencias de los compuestos ensayados se calcularon las CE_{100} , a partir de las cuales se obtuvo el orden de potencias siguiente:

PCP > TCP > (+)-3-PPP > MK-801 > Dextrorfano >> Dextrometorfano

De hecho, la potenciación por dextrometorfano a las concentraciones ensayadas fue tan pequeña que no permitió calcular su CE_{100} .

La mayor potencia del TCP frente al MK-801 coincide con el orden establecido por Massamiri y Duckles (1990) en arteria caudal de rata, así como el efecto inhibitor del haloperidol que, aunque *in vitro* inhibe la captación de [3 H]NA, presenta un efecto directo inhibitor de las contracciones del músculo liso mucho más potente que enmascara la potenciación del efecto de la NA (Fox y col., 1991). De hecho, existen trabajos que demuestran un antagonismo por haloperidol de las respuestas a NA y dopamina en conducto deferente de rata (Miranda y col., 1988).

En lo que respecta a la inducción de actividad espontánea, el PCP, el TCP y el (+)-3-PPP la mostraron mayor o igual que el MK-801, el dextrorfano mostró muy poca y el dextrometorfano no la presentó. Este fenómeno se correlaciona con su capacidad para potenciar el efecto de la NA exógena. El haloperidol también indujo actividad espontánea en el deferente de rata, tal y como describen otros trabajos (Miranda y col., 1988), aunque el mecanismo por el que lo hace no está todavía bien establecido.

Los mismos compuestos se ensayaron posteriormente sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica. Todos ellos, excepto el haloperidol que nuevamente inhibió, potenciaron las contracciones neurogénicas en la porción epididimal del conducto deferente de rata. El orden de potencias resultó ser:

(+)-3-PPP > PCP > MK-801 > Dextrometorfano > TCP >>> Dextrorfano

Este orden no se correlaciona, sin embargo, con el obtenido frente a NA exógena. El (+)-3-PPP, ligando σ , pasa a ser el más efectivo y el dextrometorfano, también ligando σ , que no potenciaba de forma significativa la NA exógena, pasa a ser más potente que el TCP. Dejando a un lado al haloperidol, se aprecia sin embargo una tendencia a una mayor efectividad de los ligandos σ en la potenciación de las contracciones inducidas eléctricamente. Cabe destacar que, en el deferente de rata, el ATP actúa como cotransmisor y que, aunque es mayoritario en la porción prostática, también se libera en la epididimal cuando se estimula eléctricamente el órgano. Los trabajos de Matsuno y col., (1993; 1995) en conducto deferente aislado de ratón, donde predomina la neurotransmisión por ATP, concluyen que la potenciación provocada por algunos ligandos σ sobre las contracciones neurogénicas está mediada por receptores σ diferentes a los σ_1 y σ_2 conocidos que estimularían la liberación de este nucleótido. Así pues, si se diera lo mismo en el deferente de rata, nos encontraríamos ante un efecto mixto entre inhibición de la captación de la NA y estimulación de la liberación de ATP mediante un posible receptor sigma. De este modo, encontraríamos como más efectivos los compuestos que, además de ser ligandos sigma potentes, se mostraran también más potentes inhibiendo la captación de NA. Si se analizan conjuntamente las afinidades por el receptor sigma y potencia inhibiendo la captación de noradrenalina tritiada (ver más adelante y CI_{50} en el apartado de resultados), el orden obtenido en la potenciación de las contracciones neurogénicas toma sentido.

*b) EFECTOS SOBRE LA UNIÓN DE LA [³H]NISOXETINA EN
MEMBRANAS DE CONDUCTO DEFERENTE.*

A fin de determinar un posible efecto de los ligandos PCP y sigma estudiados sobre el transportador de noradrenalina en el conducto deferente de rata, hacía falta previamente caracterizar la unión al mismo de un marcador específico de estos lugares como es la [³H]nisoxetina, que ha demostrado ser más específico que otros marcadores como la [³H]desipramina.

Tal como ya se ha dicho previamente, la mayoría de transportadores para neurotransmisores dependen del sodio para funcionar. Por ello se evaluó la influencia de la concentración de sodio del medio sobre la unión de la [³H]nisoxetina en nuestra preparación. Como era de esperar, los resultados obtenidos demuestran que la unión de la [³H]nisoxetina a las membranas de conducto deferente de rata es altamente dependiente de la concentración de Na⁺ en el medio, encontrándose un aumento considerable de la unión específica (de 2.270 a 7.090 dpm) al aumentar la concentración del catión en el medio de incubación (de 40 a 300 nM). Estos datos corroboran los proporcionados por Tejani-Butt y col. (1990) en experimentos realizados en sistema nervioso central (SNC) con este radioligando.

Los resultados de los ensayos cinéticos de asociación realizados en membranas de conducto deferente de rata con [³H]nisoxetina se ajustan a una representación de tipo monoexponencial, lo cual confirma la existencia de una única población de lugares de unión para este radioligando. También se deduce de los mismos que el equilibrio de la unión radioligando-receptor a 0-4 °C se alcanza a partir de las 2 horas de incubación y permanece estable, como mínimo, hasta las 3,5 horas..

La representación semilogarítmica de los valores obtenidos en los ensayos cinéticos de disociación de la [³H]nisoxetina resulta completamente lineal. Por lo tanto, nos encontramos ante una cinética de primer orden que corrobora de nuevo la existencia de una sola población de lugares de unión para este radioligando en las membranas de conducto deferente de rata.

En los estudios de saturación realizados, se ha obtenido un coeficiente de Hill de $1,003 \pm 0,017$ para la unión de la [³H]nisoxetina, valor que indica claramente la presencia de una sola población de lugares de unión. Asimismo, se ha obtenido una K_D de $1,63 \pm 0,36$ nM, lo que demuestra la elevada afinidad del radioligando por el transportador de NA.

Otros estudios de unión en membranas de conducto deferente de rata, pero utilizando [³H]desipramina como radioligando (Pekelmann y de Avellar, 1992) presentan unos valores de K_D de 3 nM, lo cual indica que la nisoxetina es más afín para estos lugares de unión que la desipramina, en concordancia con estudios anteriores en SNC realizados por otros autores (Tejani-Butt, 1992).

De nuestros experimentos se ha obtenido una densidad de lugares de unión (B_{max}) de 1.625 ± 500 fmoles/mg, mientras que dicho valor en otros trabajos (Pekelmann y de Avellar, 1992) es de 462 fmoles/mg. Esta diferencia podría deberse al diferente método de preparación de las membranas empleado (diferente secuencia de centrifugaciones) y a la diferencia en la cepa de ratas empleada (Wistar, mientras que nuestros experimentos se realizaron con ratas Sprague-Dawley).

Una vez caracterizado el perfil de unión de la [³H]nisoxetina a la preparación de membranas de conducto deferente de rata, se han realizado ensayos de competición con los ligandos σ y PCP para determinar su posible interacción con el transportador de la noradrenalina en este tejido.

Ligandos PCP como el MK-801, el dextrorfano, la fenciclidina y la tenociclidina inhibieron de manera competitiva (tal como muestran los coeficientes de Hill y la similitud entre la CI_{50} y la K_i de cada compuesto), y a concentraciones micromolares, la unión de la [³H]nisoxetina en membranas de conducto deferente de rata. Por lo que respecta a los ligandos σ ensayados (haloperidol, dextrometorfano y (+)-3-PPP), éstos también fueron capaces de inhibir la unión del radioligando de manera competitiva (excepto el (+)-3-PPP, que lo hizo de forma no competitiva) a unas CI_{50} micromolares. El rango de potencias obtenido para todos estos compuestos, en función de las CI_{50} , fue el siguiente:

Haloperidol > Dextrometorfano > MK-801 > Dextrorfano >
> (+)-3-PPP > Fenciclidina > Tenociclidina

Este orden de potencias es el mismo que el descrito en células cromafines utilizando [^3H]desipramina como radioligando (Rogers y Lemaire, 1992). De hecho, existe una muy buena correlación entre los resultados obtenidos por estos autores en células cromafines y los nuestros en conducto deferente de rata utilizando la [^3H]nisoxetina como marcador, tal como puede verse en la figura siguiente:

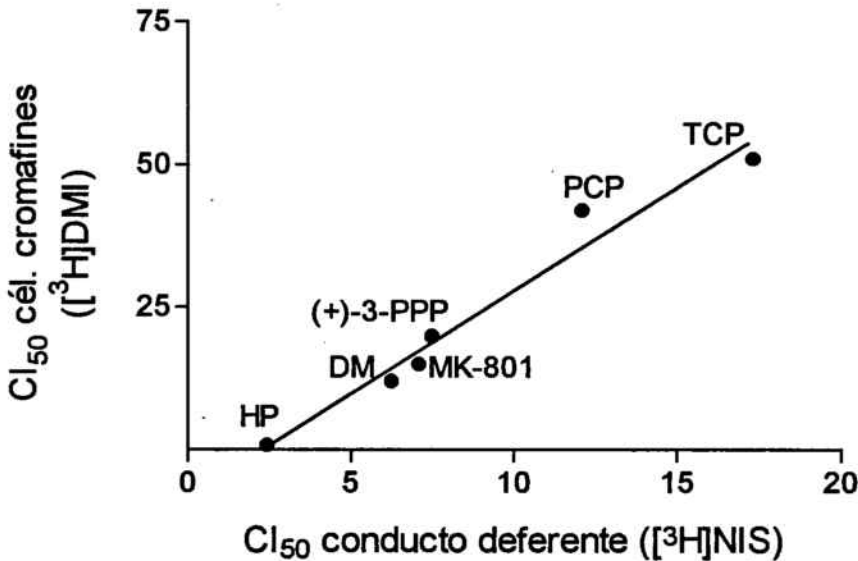


Figura 36.- Correlación entre las CI_{50} de diversos ligandos σ y PCP en células cromafines bovinas utilizando [^3H]desipramina como marcador (Rogers y Lemaire, 1992) y nuestros resultados en membranas de conducto deferente de rata utilizando [^3H]nisoxetina como radioligando. ($r = 0,982$, $v = 4$, $P < 0,001$).

Como puede observarse, este orden es independiente de las afinidades respectivas de estos compuestos por los receptores σ (haloperidol > (+)-3-PPP > dextrometorfano > dextrorfano) y PCP_1 (MK-801 > TCP > PCP > dextrorfano), por lo que *a priori* se descartaría la participación de los mismos en este efecto. Por otra parte, la competitividad observada en la mayoría de ellos refuerza esta apreciación. En la presente memoria se demuestra que el MK-801 potencia el efecto de la NA en conducto deferente de rata aislado, a través de un mecanismo no relacionado con el receptor de NMDA (Pubill y col., 1996). Otros autores (Rogers y Lemaire, 1992) descartan la participación de receptores σ en este efecto ya que el DTG, un compuesto que posee gran afinidad por

los receptores σ_1 y σ_2 centrales y periféricos (Walker y col., 1990), no alteró la unión de la [^3H]desipramina en las células cromafines bovinas. Además, trabajos previos (Massamiri y Duckles, 1991) demostraban que la inhibición de la unión de la [^3H]DMI, en preparaciones de cerebro de rata, por el 3-PPP no era estereoselectiva, mientras que la unión a los receptores σ sí que lo es.

El haloperidol, un fármaco que posee afinidad nanomolar por los receptores σ (Walker y col., 1990), resultó ser el inhibidor más potente de la unión de la [^3H]NIS, pero a concentraciones micromolares. Por otra parte, el hecho de que un compuesto como el MK-801, que no presenta prácticamente afinidad por los receptores σ , muestre una efectividad similar desplazando a la [^3H]NIS que un ligando selectivo σ como es el (+)-3-PPP, permite deducir que los receptores σ no están implicados en este efecto.

De todos modos, si se deja de lado al (+)-3-PPP, el patrón de desplazamiento competitivo del resto de compuestos ensayados permite establecer un orden de potencias de acuerdo al valor de la K_i : haloperidol > (+)-3-PPP > dextrometorfano > dextrorfano > MK-801 > PCP > TCP. En este caso, el orden resultante desvela una ligera mayor afinidad de los ligandos σ , inhibiendo la unión de la [^3H]NIS, que los ligandos PCP, aunque ello no querría decir que los receptores σ estuvieran implicados.

Por otra parte, otros estudios en conducto deferente de rata aislado (Fox y col., 1991) utilizando (\pm)-pentazocina, PCP y N-alilnormetazocina también descartan que la potenciación de las contracciones neurogénicas por estos compuestos sea mediada por receptores sigma, apuntando a la inhibición del *uptake* de NA como el mecanismo más probable. En nuestros experimentos, el PCP inhibió, a concentraciones micromolares bajas, la unión de la [^3H]NIS en este órgano, con lo cual dicha hipótesis se ve reforzada.

Se ha descrito que la inhibición de la unión de la [^3H]DMI por ligandos σ y PCP en células cromafines bovinas (Rogers y Lemaire, 1992) es de tipo no competitivo. En la presente memoria, todos los compuestos ensayados menos el (+)-3-PPP inhibieron la unión de la [^3H]NIS de manera competitiva. Jayanthi y col., (1993) describen que, en membranas de placenta humana, los lugares de unión de la noradrenalina y de la

nisoxetina son los mismos o muestran un considerable solapamiento estérico, mientras que parece ser que el lugar de modulación alostérica de la DMI podría estar un poco más apartado. La diferencia en los puntos de unión de ambos marcadores podría explicar esta diferencia de competitividad.

Todos estos resultados permiten concluir que los ligandos σ y PCP ensayados inhiben el transporte de NA uniéndose al lugar del transportador que es marcado por la [^3H]NIS y que, probablemente, no es exactamente el mismo que marca la [^3H]DMI.

c) EFECTO SOBRE LA CAPTACIÓN DE [^3H]NORADRENALINA.

Paralelamente a la caracterización molecular del transportador de noradrenalina con [^3H]nisoxetina y su modulación por los ligandos σ y PCP, se procedió a estudiar el efecto de estos compuestos sobre la captación de [^3H]noradrenalina en la porción epididimal del conducto deferente de rata.

Primeramente, mediante ensayos cinéticos, se establecieron las condiciones experimentales idóneas para posteriormente estudiar el efecto de cada uno de los ligandos. En los ensayos cinéticos de incorporación realizados se observa un incremento prácticamente lineal de la captación de [^3H]noradrenalina durante los primeros 30 minutos de incubación. El tiempo de incubación escogido para los ensayos de inhibición fue de 3 minutos ya que este tiempo, además de ser corto, corresponde a la zona más lineal de la cinética de captación y, además, es el tiempo empleado por otros autores (Finberg y col., 1992) en este tipo de experimentos.

Todos los ensayos se llevaron a cabo en presencia de una concentración de Na^+ de 300 mM ya que, como ya está descrito, la funcionalidad del transportador es altamente dependiente de la concentración de este catión en el medio.

En los ensayos de inhibición realizados, tanto los ligandos σ como PCP ensayados fueron capaces de inhibir la captación de [^3H]noradrenalina en la parte

epididimal del conducto deferente de rata a concentraciones micromolares. El orden de potencias encontrado ha sido:

Dextrorfano > MK-801 > Fenciclidina > (+)-3-PPP > Haloperidol >
> Tenociclidina > Dextrometorfano

Al igual que en los ensayos de unión con [³H]nisoxetina, la potencia de estas sustancias para inhibir la incorporación de [³H]noradrenalina parece que no depende de su afinidad por sus respectivos receptores.

Puede observarse, sin embargo, que la potencia de estos compuestos para inhibir la unión de la [³H]nisoxetina no se correlaciona del todo con su capacidad para inhibir la incorporación de [³H]noradrenalina. Esta variación podría atribuirse primeramente a la diferencia entre los sustratos empleados en los dos tipos de experimentos ya que, aunque ambos provienen del conducto deferente, uno es una suspensión de membranas mientras que el otro es un tejido completo y estructurado, con los impedimentos de acceso al lugar de unión que ello conlleva. Por otra parte, la afinidad de un compuesto por un lugar de unión no implica que ello se traduzca en un efecto funcional, especialmente cuando se trata de transportadores.

Así pues, todos los compuestos ensayados se mostraron capaces de inhibir la unión de la [³H]nisoxetina, así como la captación de [³H]noradrenalina en conducto deferente de rata, estando en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores en sistema nervioso central, células cromafines y arteria caudal de rata (Rogers y Lemaire, 1991, 1992; Massamiri y Duckles, 1990, 1991).

El dextrometorfano, un fármaco ampliamente utilizado como antitusígeno, y su metabolito dextrorfano, han demostrado presentar actividad sobre el transporte de NA y sobre las respuestas inducidas por la misma. Ello podría explicar parte de los efectos indeseables de estos compuestos cuando su uso es prolongado o se produce una sobredosificación.

*d) Efecto del MK-801 sobre la presión arterial
en rata anestesiada.*

La potenciación de las respuestas a NA en conducto deferente y la inhibición del transporte de la misma por el MK-801 nos llevó a pensar que esta interacción podría tener repercusión a nivel sistémico, en animal entero, provocando un incremento de la presión arterial. Algunos trabajos describen aumentos de presión y frecuencia cardíaca después de la administración de este fármaco (Rockhold y col., 1992), aunque no especifican el mecanismo por el cual se produce y son realizados en rata consciente.

Otros autores (Kubo y col., 1993) han descrito que, en ratas, los receptores NMDA median la hipertensión inducida por la estimulación del seno quimiorreceptor carotídeo con NaH_2PO_4 . La inyección de MK-801 en una determinada zona del encéfalo inhibía esta respuesta presora quimiorrefleja. Por lo tanto, el hecho de que este compuesto, administrado sistémicamente, induzca un aumento de presión arterial, indica que su acción global es mucho más compleja.

En nuestros experimentos, la administración endovenosa de MK-801 a ratas anestesiadas con pentobarbital provocó un aumento de presión arterial dosis-dependiente que iba acompañado, sin embargo, de una posterior caída de la misma por debajo de la línea basal.

La vagotomía bilateral no inhibía la caída subsiguiente al aumento y, por lo tanto, ello permite descartar que la caída sea debida a una acción refleja por la subida inicial. Por otra parte, la anulación del control del SNC mediante la desmedulación provocó la desaparición de esta caída. Estos dos hechos permiten deducir que esta caída se debe a un mecanismo central, que bien podría ser mediada por receptores NMDA tal y como describen Kubo y col. (1993).

Además, el MK-801, a dosis utilizadas en ensayos conductuales (0,3 mg/kg), fue capaz de potenciar el incremento de presión inducido por la administración endovenosa de noradrenalina (0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en rata desmedulada. Este resultado, sumado a que todos

nuestros anteriores experimentos demostraban que el MK-801 era capaz de potenciar la actividad noradrenérgica inhibiendo la recaptación de NA, nos llevó a probar que, si el efecto presor de este fármaco era debido a una acción adrenérgica indirecta, aumentando la NA del espacio sináptico, debería inhibirse al administrar prazosina previamente al MK-801. La prazosina no anuló la respuesta presora del MK-801 de forma significativa, aunque se observa que el aumento de presión inducido por el MK-801 en presencia de este antagonista α_1 es menor que en los animales no pretratados.

Por otra parte, sin embargo, en ratas reserpinizadas se observó una disminución significativa en el incremento de presión arterial. Este hecho, unido a la tendencia a la inhibición por prazosina descrito antes, permite pensar que el efecto presor podría tener, pues, parte de componente adrenérgico en concordancia con los resultados obtenidos con otras técnicas.

Para determinar si existía un efecto β -adrenérgico en la acción presora del MK-801 se bloquearon dichos receptores con propranolol. Sorprendentemente, al administrar a continuación el MK-801, los animales morían. Ello podría ser debido a que el MK-801, *per se* o más probablemente por interacción con el pentobarbital, provocara una bradicardia y una depresión respiratoria paralela a la caída secundaria de presión que acontece que, en condiciones normales, serían remontada por un estímulo adrenérgico reflejo (de hecho es lo que se observa en las ratas no pretratadas). Esta recuperación de la frecuencia cardíaca y respiratoria vía estímulo adrenérgico no sería posible cuando los receptores β están bloqueados. De hecho, se ha descrito en ratas anestesiadas con pentobarbital la aparición de cierta depresión respiratoria al administrar MK-801 que se atribuye a un efecto central (Connelly y col., 1992).

La diferencia entre los porcentajes de incremento de presión por MK-801 entre ratas normales y desmeduladas resultó ser no significativa. De ello puede concluirse que el efecto presor del MK-801 es el mismo en rata normal que en rata desmedulada. Por lo tanto, el efecto presor se debe a un mecanismo periférico, mientras que la caída subsiguiente, tal y como ya se ha comentado, se debe a un efecto central de mayor peso específico en nuestra preparación.

IV.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El MK-801 potencia, de manera concentración-dependiente, las respuestas tanto a la noradrenalina exógena como a la estimulación eléctrica, en conducto deferente aislado de rata. Dicha potenciación no es debida a un efecto directo a nivel postsináptico (α_1).
- 2.- Se descarta tanto la participación del receptor NMDA como la implicación de receptores α_2 en este efecto potenciador.
- 3.- La potenciación del efecto de la noradrenalina exógena por MK-801 no depende de las reservas endógenas de dicho neurotransmisor y, en principio, puede descartarse que se deba a un aumento en la liberación del mismo.
- 4.- De las anteriores conclusiones y del hecho de que el efecto potenciador del MK-801 se anula al disminuir el sodio del medio, se concluye que el mecanismo responsable es la inhibición de la recaptación de noradrenalina.
- 5.- Al igual que la desipramina, inhibidor de la recaptación de noradrenalina, el MK-801 es capaz de inducir un aumento muy marcado de la actividad espontánea en el conducto deferente aislado de rata.

6.- Excepto el haloperidol, los demás ligandos PCP y σ ensayados fueron también capaces de potenciar el efecto de la noradrenalina exógena, con un orden de potencia:

PCP > TCP > MK-801 > (+)-3-PPP > Dextrorfano >> Dextrometorfano

7.- Análogamente, los anteriores compuestos, excepto el haloperidol que inhibió, potenciaron las contracciones inducidas por estimulación eléctrica, aunque con un orden de potencia diferente:

(+)-3-PPP > PCP > MK-801 > Dextrometorfano > TCP >>> Dextrorfano

8.- Por ello, además de un efecto inhibitorio de la recaptación de la noradrenalina, no se descarta, la participación de receptores σ en la potenciación de las contracciones neurogénicas.

9.- La unión de la [3 H]nisoxetina en membranas de conducto deferente de rata es sodio-dependiente y marca, de manera específica, selectiva y estable, una población homogénea de sitios de unión.

10.- Los ligandos sigma y PCP ensayados inhiben, de manera competitiva (excepto el (+)-3-PPP), la unión de la [3 H]nisoxetina a dicha preparación, con unas CI_{50} de orden micromolar.

11.- Análogamente, dichos compuestos son capaces de inhibir, a concentraciones micromolares, la incorporación de [3 H]noradrenalina en secciones de conducto deferente de rata.

12.- Por lo tanto, los ligandos sigma y PCP inhiben la captación neuronal de noradrenalina en el conducto deferente de rata al interactuar con el lugar de su transportador que marca la [3 H]nisoxetina.

13.- El MK-801 provoca *per se* un aumento transitorio de la presión arterial en rata anestesiada, seguido de un descenso de la misma por debajo del valor basal. Dicho descenso también tiene lugar en ratas vagotomizadas, con lo que se descarta que sea una respuesta refleja.

14.- Ya que este compuesto es capaz también de potenciar el efecto presor de la noradrenalina en rata desmedulada y en esta preparación no se produce el descenso subsiguiente, se demuestra que el incremento de presión que provoca el MK-801 es un efecto periférico, mientras que el descenso se debe a un mecanismo central.

15.- Los ligandos σ y PCP, además de ejercer sus efectos centrales, son capaces de potenciar el efecto de la noradrenalina a nivel periférico, repercutiendo en la actividad de los sistemas fisiológicos que de ella dependen.

V.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Ambache, N., Zar, M.A.

Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea-pig vas deferens.

J. Physiol., 216, 359-389

1971

Amobi, N.I.B., Smith, I.C.H.

A study of the post-tetanic twitch depression at the prostatic end of the rat vas deferens.

Eur. J. Physiol., 408, 628-633

1987

Anis, N.A., Berry, S.C., Borton, N.R., Lodge, D.

The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-D-aspartate.

Br. J. Pharmacol., 79, 565

1983

Aram, J.A., Martin, D., Tomczyk, M., Zeman, S., Millar J., Pohler, G., Lodge, D.

Neocortical epileptogenesis in vitro: Studies with N-methyl-D-aspartate, phencyclidine, sigma and dextromethorphan receptor ligands.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 248, 320-28

1989

Avellar, M.C.W.; Kobashi, Y.L.; Markus, R.P.

Age related changes in neuronal uptake of noradrenaline.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. pharmacol., 341, 295-300

1990

Axelrod, J.; Weil-Malherbe, H.; Tomchick, R.

The physiological disposition of [³H]-epinephrine and its metabolite metanephrine.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 127, 251-256

1959

Backstrom, I.T.; Ross, S.B.; Marcusson, J.O.

[³H]Desipramine binding to rat brain tissue: Binding to both noradrenergic uptake sites and sites not related to noradrenaline neurons.

J. Neurochem, 52, 1099-1106

1989

Banerjee, D.K.; Lutz, R.A.; Levine, M.A.; Rodbard, D.; Pollard, H.B.

Uptake of norepinephrine and related catecholamines by cultured chromaffin cells: characterization of cocaine-sensitive and -insensitive plasma membrane transport sites.

Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 1749-1753

1987

Benveniste, M., Clements, J., Vyklicky, I., Mayer, M.L.

A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones.

J. Physiol., 428, 333-357

1990

Bogdanski, D.F.; Brodie, B.B.

Role of sodium and potassium ions in storage of norepinephrine by sympathetic nerve endings.

Life. Sci., 5, 1563-1569

1966

Bonhaus, D.W., Burge, B.c., McNamara, J.O.

Biochemical evidence that glycine allosterically regulates an NMDA receptor-coupled ion channel.

Eur. J. Pharmacol., 142, 489-490

1987

Booth, R.G., Wyrick, S.D., Baldessarini, R.J., Kula, N.S., Myers, A.M., Mailman, R.B.

A new sigma-like receptor recognized by novel phenylaminotetralins: ligand binding and functional studies.

Mol. Pharmacol., 44, 1232-1239

1993

Bowen, W.D., Vilner, B.J., Lee, K.S., He, X.S., de Costa, B.R., Weinberger, D.R.

A haloperidol-insensitive binding site for sigma-active aryl ethylene diamine-related compounds: a novel sigma receptor subtype ?

Soc. Neurosci. Abstr., 21, 219.6, 526

1995

Bowyer, J.F.; Spuhler, K.P.; Weiner, N.

Effects of phencyclidine, amphetamine and related compounds on dopamine release from and uptake into striatal synaptosomes.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 229, 671-680

1984

Bradford, M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem 72, 248-254

1976

- Brady, K.T., Balster, R.T. May, E.L.
Stereoisomers of N-allylnormetazocine: phencyclidine-like behavioral effects in squirrel monkeys and rats.
Science (Washington DC), 215, 178-180
1982
- Campbell, B. G.; Bobker, D. H.; Leslie, F. M.; Mefford, I. N.; Weber, E.
Both the sigma receptor-specific ligand (+)-3-PPP and the PCP receptor-specific ligand TCP act in the mouse vas deferens via augmentation of electrically evoked norepinephrine release.
Eur. J. Pharmacol., 138, 447-449.
1987
- Carbonell, L.F., Garcia-Estany, J., Ubeda, M., Salom, M.G., Fendy, F., Quesada, T.
Blood pressure control in pithed rat.
Gen. Pharmacol., 17, 469-472
1986
- Carpenter, C.L., Marks, S.S., Watson, D.L., Greenberg, D.A.
Dextromethorphan and dextrorphan as calcium channel antagonists.
Brain Res., 439, 372-75
1988
- Chapman, A.G., Meldrum, B.S.
Non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists protect against sound-induced seizures in DBA/2 mice.
Eur. J. Pharmacol., 166, 210-11
1989
- Choi, D.W.
Dextrorphan and dextromethorphan attenuate glutamate neurotoxicity.
Brain Res., 403, 333-36
1987
- Choi, D.W., Peters, S., Visenkul, V.
Dextrorphan and levorphanol selectively block N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity on cortical neurons.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 242, 713-20
1987
- Clineshmidt, B.V., Martin, G.E., Bunting, P.R.
Anticonvulsant activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties.
Drug Dev. Res. 2, 123
1982a
- Clineshmidt, B.V., Martin, G.E., Bunting, P.R., Papp, N.L.
Central sympathomimetic activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties.
Drug Dev. Res. 2, 135
1982b

Clineshmidt, B.V., Williams, M., Witoslawski, J.J., Bunting, P.R., Risley, E.A., Totaro, J.A.
Central sympathomimetic activity of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5,10-imine (MK-801), a substance with potent anticonvulsant, central sympathomimetic, and apparent anxiolytic properties.

Drug Dev. Res. 2, 147
1982c

Connelly, C.A., Otto-Smith, M.R., Feldman, J.L.
Blockade of NMDA receptor-channels by MK-801 alters breathing in adult rats.
Brain Res., 596 (1-2), 99-110
1992

Danyasz, W., Parsons, C.G., Bresink, I., Quack, G.
Glutamate in CNS Disorders.
Drug News Persp. 8 (5), 261-277
1995

Debonnel, G.
Current hypotheses on sigma receptors and their physiological role: possible implications in psychiatry.
J. Psychiatry. Neurosci., 18(4), 157-72,
1993

Debonnel, G., de Montigny, C.
Modulation of NMDA and dopaminergic neurotransmissions by sigma ligands: possible implications for the treatment of psychiatric disorders.
Life Sci 58(9),721-734
1996

Di Porzio, U., Smith S.V. Novotny, E.A., Morelli, F., Barker, J.L.
Two functionally different glutamate receptors of the kainate subtype in embryonic rat mesencephalic cells.
Exp. Neurol., 120, 202-213
1993

Downes, C.P., Lewis, P.E., Stone, M.A.
Comparison of the binding of sigma opioids and phencyclidine, and the interaction of antipsychotic drugs in rat brain membranes.
Br. J. Pharmacol., 88, 231-237
1986

East, S.J., Garthwaite, J.
Actions of a metabotropic glutamate receptor agonist in immature and adult rat cerebellum.
Eur. J. Pharmacol., 219. 395-400
1992

Eimerl, S.; Schramm, M.
An endogenous metal appears to regulate NMDA receptor mediated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx and toxicity in cultured cerebellar granule cells.
Neurosci. Lett., 137, 198-202
1992

- Eimerl, S.; Schramm, M.
Potentiation of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and acute toxicity mediated by the NMDA receptor: the effect of metal binding agents and transition metal ions.
J. Neurochem., 61, 518-525
1993
- Erdö, S. L.
Excitatory amino acid receptors in the mammalian periphery.
Trends in Pharmacol. Sci., 12, 426-29
1991
- Euler, U.S., von Hedquist, P.
Inhibitory action of prostaglandin E₁ and E₂ on the neuromuscular transmission in the guinea pig vas deferens.
Acta Physiol. Scand., 93, 572-573
1975
- Finberg, J.P.M.; Kremer, I.; Spanir, R.; Lenox, R. H.; Klein, E.
Peripheral noradrenergic function during chronic lithium treatment in the rat.
J. Neural Transm [Gen Sect.], 87, 77-83.
1992
- Flavahan, N.A., Mc. Grath, J.C.
An analysis of α_1 and α_2 adrenoceptor mediated pressor effects of adrenaline.
Br. J. Pharmacol., 72, 519P
1981
- Foster, A.C.; Fagg, G.E.
Taking apart the NMDA receptor
Nature., 329, 395-396
1987
- Fox, P.K., France, L., Nicholson, C.D.
Lack of involvement of presynaptic sigma receptors in the PCP-stimulated enhancement of twitches in rat vas deferens.
Br. J. Pharmacol., 98, 866
1989
- Fox, P.K., Connick, J.H., Hanlon, G.M., France, L., Nicholson, C.D.
The lack of utility of the rat vas deferens as a functional bioassay for σ ligands.
Eur. J. Pharmacol., 193, 139-43
1991
- Franklin, P.H., Murray, T.F.
High affinity [^3H]dextrorphan binding in rat brain is localized to a noncompetitive antagonist site of the activated N-methyl-D-aspartate receptor-cation channel.
Mol. Pharmacol., 41, 134-46
1992

Friedrich, U.; Bönisch, H.

The neuronal noradrenaline transport system of PC-12 cells: kinetic analysis of the interaction between noradrenaline, sodium and chloride in transport.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 333, 246-252

1986

Gehlert, D. R.; Hemrick-Luecke, S. K.; Schober, D. A.; Krushinski, J.; Howbert, J. J. et al.

(R)-Thionisoxetine, a potent and selective inhibitor of central and peripheral norepinephrine uptake.

Life Sciences, 56(22), 1915-20

1995

George, C.P., Goldberg, M.P., Choi, D.W., Steinberg, G.K.

Dextromethorphan reduces neocortical ischemic neuronal damage in vivo.

Brain Res., 440, 375-79

1988

Gillespie, J.S. Macrae, I.M.

The contractile response to and the release of noradrenaline by transmural nerve stimulation in the guinea pig vas deferens and a comparison with the response to noradrenaline.

Br. J. Pharmacol., 80, 477-484

1983

Goldstein, S.R., Matsumoto, R.R., Thompson, T.L., Patrick, R.L., Bowen, W.D. Walker, J.M.

Motor effects of two sigma ligands mediated by nigrostriatal dopamine neurons.

Synapse., 4, 254-258

1989

Grimwood, S., Wilde, G.J.C., Foster, A.C.

Interactions between the glutamate and glycine recognition sites of the N-methyl-D-aspartate receptor from rat brain, as revealed from radioligand binding studies.

J. Neurophysiol., 60, 1729-1738

1993

Guiramand, J., Vignes, M., Recasens, M.

A specific transduction mechanism for the glutamate action on phosphoinositide metabolism via the quisqualate metabotropic receptor in rat brain synaptoneuroosomes: I. External Na⁺ requirement.

J. Neurochem., 57, 1488-1500

1991a

Guiramand, J., Vignes, M., Recasens, M.

A specific transduction mechanism for the glutamate action on phosphoinositide metabolism via the quisqualate metabotropic receptor in rat brain synaptoneuroosomes: II. Calcium dependency, cadmium inhibition.

J. Neurochem., 57, 1501-1509

1991b

Gundlach, A.L., Largent, B.L., Snyder, S.H.

Phencyclidine and sigma opiate receptors in brain: biochemical and autoradiographic differentiation.

Eur. J. Pharmacol., 113, 465-466

1985

- Gundlach, A.L., Largent, B.L., Snyder, S.H.
Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+).³H]-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)-piperidine.
J. Neurosci., 6, 1757-1770
1986
- Haertzen, C.A.
Subjective effects of narcotic antagonists cyclazosine and nalorphine on the addiction research center inventory (ARCI).
Psychopharmacology., 18, 366-377
1970
- Heinonen, E., Akerman, K.E.O., Panula, P.
Changes of the membrane potential in striatal synaptoneurosome, synaptoneurosome, synaptosome measured with a cyanine dye DiS-C2-(%).
Brain Res., 496, 187-196
1989
- Hirst, G.D.S., Neil, T.O.
Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle.
Nature., 283, 769-772
1980
- Itzhak, Y.
³H]PCP-3-OH and (+)³H]SKF 10047 binding sites in rat brain membranes: evidence of multiplicity.
Eur. J. Pharmacol., 136, 231-234
1987
- Iversen, L., Kravitz, E.A.
Sodium dependence of transmitter uptake and adrenergic nerve terminals.
Mol. Pharmacol., 2, 360-362
1966
- Jacques, S. Jr., Tobes, M.C., Sisson, J.C., Baker, J.A., Wiland, D.M.
Comparison of the sodium dependency of uptake of metaiodobenzylguanidine and norepinephrine into cultured bovine adrenomedullary cells.
Mol. Pharmacol., 26, 539-546
1984
- Javitch, J.A., Blaustein, R.O., Snyder, S.H.
³H]Mazindol binding associated with neuronal dopamine and norepinephrine uptake sites.
Mol. Pharmacol., 26, 35-44
1984
- Javitch, J.A., Strittmatter, S.M., Snyder, S.H.
Differential visualization of dopamine and norepinephrine uptake in sites in rat brain using [³H]mazindol autoradiography.
J. Neurosci., 5, 1513-1521
1985

Jayanthi, L.D., Prassat, P.D., Ramamoorthy, S., Mahesh, V.B., Leibach, F.H., Ganapathy, V.
Sodium- and Chloride-Dependent, Cocaine-Sensitive, High-Affinity Binding of Nisoxetine to the Human Placental Norepinephrine Transporter.
Biochemistry, 32, 12178-12185
1993

Johnson, J.W., Ascher, P.
Glycine potentiates the NMDA response in the cultured mouse brain neurons.
Nature., 325, 529-31
1987

Johnson, K.M., Snell, L.D.
Effects of phencyclidine (PCP)-like drugs on turning behaviour, [³H]-dopamine uptake and [³H]-PCP binding.
Pharmacol. Biochem. Behav., 22, 731-735
1985

Kawai, M., Horikawa, Y., Ishihara, T., Shimamoto, K., Ohfuné, Y.
2-(carboxycyclopropyl)glycines: binding, neurotoxicity and induction of intracellular free Ca²⁺.
Eur. J. Pharmacol., 211, 195-202
1992

Keats, A.S., Telford, J.
Narcotic antagonists as analgesics.
Adv. Chem. Ser., 45, 170-176
1964

Keller, B., Graefe, K-H.
The inhibitory effect of some monovalent cations on the stimulation by Na⁺ of the neuronal uptake of noradrenaline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 309, 89-97
1979

Kenakin, T.P.
Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction.
Raven Press.
1987

Kenigsberg, R.L., Trifaro, J.M.
Presence of a high-affinity uptake system for catecholamines in cultured bovine adrenal chromaffin cells.
J. Neurosci., 5, 1547-1556
1980

Kennedy, C., Henderson, G.
An examination of the putative σ -receptor in the mouse isolated vas deferens.
Br. J. Pharmacol., 98, 429-436
1989

- Kiedrowski, L., Wroblewski, J.T., Costa, E.
Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate.
Mol. Pharmacol. 45, 1050-1054
1994
- Kleckner, N.W., Dingledine, R.
Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes.
Science 241, 835-837
1988
- Klein, M., Musacchio, J. M.
High Affinity Dextrometorphan Binding Sites in Guinea Pig Brain. Effect of Sigma Ligands and Other Agents.
J. Pharm. Exp. Ther., 251, 1, 207-15.
1989
- Kubo, T., Amano, M., Asari, T.
NMDA receptors but not non-NMDA receptors mediate hypertension induced by carotid body chemoreceptor stimulation in the rostral ventrolateral medulla of the rat.
Neurosci. Lett., 164, 113-16
1993
- Kudo, Y., Akita, K., Ishida, M., Shinozaki, H.
A significant increase in intracellular Ca^{2+} concentration induced by (2s,3r,4s)-2-carboxycyclopropylglycine, a new potent NMDA agonist, in cultured rat hippocampal neurons.
Brain Res., 567, 342-345
1991
- Kuko, T., Wada, J.A.
Antiepileptic effect of dextromethorphan on amygdaloid-kindled seizures in cats.
Epilepsia (Basel), 30, 669
1989
- Lara, H., Bastos-Ramos, W.
Glutamate and kainate effects on the noradrenergic neurons innervating the rat vas deferens
J. Neurosci. Res., 19, 239-44
1988
- Largent, B.L., Gundlach, A.L., Snyder, S.H.
Psychotomimetic opiate receptors labeled and visualized with (+)-[³H]3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine.
Neurobiology, 81, 4983-4987
1984
- Lee, C.M., Snyder, S.H.
Noepinephrine neuronal uptake binding sites in rat brain membranes labeled with [³H]desipramine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78, 5250-5254
1981

- Lee, C.M., Javitch, J.A., Snyder, S.H.
Characterization of [³H]desipramine binding associated with neuronal norepinephrine uptake sites in rat brain membranes.
J. Neurochem., 2, 1515-1525
1982
- Lerma, J., Zukin, R.S., Benett, M.V.
Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses.
Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A. 87, 2354-2358
1990
- Liljequist, S., Ossowska, K., Grabowska-Andén, M., Andén, N.E.
Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice.
Eur. J. Pharmacol., 195, 55-61
1991
- Lodge, D., Johnson, K.M.
Non-competitive excitatory amino acid receptor antagonists.
Trends Pharmacol. Sci., 11, 81-86
1990
- Loo, P. A., Braunwalder, A. F., Williams, M., Sills, M. A.
The novel anticonvulsant MK-801 interacts with central phencyclidine recognition sites in rat brain.
Eur. J. Pharmacol., 135, 261-63.
1987
- Löscher, W., Annies, R., Hönack, D.
Comparison of competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists with regard to monoaminergic neuronal activity and behavioural effects in rats.
Eur. J. Pharmacol., 242, 263-274.
1993
- Malenka, R.C.
The role of postsynaptic calcium in the induction of long-term potentiation
Molec. Neurobiol., 5, 289-295
1992
- Malouf, A.T., Swearingen, E., and Chavkin, C.
Comparison of the actions of phencyclidine and sigma ligands on CA1 hippocampal pyramidal neurons in the rat.
Neuropharmacol., 17, 1161-1170
1988
- Mangan, J., Patterson, S.J., Tavani, A., Kosterlitz, H.W.
The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonists and antagonist properties.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 319, 197-319
1982

- Mannaioni, G., Alesiani, M., Carla, V., Natalin, B., Marinozzi, M., Pellicciari, R., Moroni, F.
Sulfate esters of hydroxy amino acids as stereospecific glutamate receptor agonist.
Eur. J. Pharmacol. 251, 201-207
1994
- Manzoni, O., Prezeau, L., Sladeczek, F., Bockaert, J.
Trans ACPD inhibits cAMP formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein.
Eur. J. Pharmacol.- Mol. Pharmacol. Sect. 244, 103-104
1993
- Martin, W.R., Eades, C.E., Thompson, J.A., Huppler, R.E.
The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 197, 517-532
1976
- Massamiri, T., Duckles, S.P.
Multiple vascular effect of sigma and PCP ligands: inhibition of amine uptake and contractile responses.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 253 (1), 124-29
1990
- Massamiri, T.; Duckles, S. P.
Interactions of sigma and phenylcyclidine receptor ligands with the norepinephrine uptake carrier in the both rat brain and rat tail artery.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 256(2), 519-24
1991
- Matsuno, K., Senda, T., Mita, S.
Correlation between potentiation of neurogenic twitch contraction and benzomorphan σ receptor binding potency in the mouse vas deferens.
Eur. J. Pharmacol., 231, 451-57
1993
- Matsuno, K., Kobayashi, T., Mita, S.
Involvement of σ -receptors in the increase in contraction of mouse vas deferens induced by exogenous ATP
J. Pharm. Pharmacol., 48, 96-9
1996
- Mc Donald, J.F., Nowak, L.M.
Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels
Trends Pharmacol. Sci.; 11, 167-172
1990
- Mc.Bain, C.J., Kleckner, N.W., Wyrick, S., Dingle, R.
Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes.
Mol. Pharmacol. 36, 556-565
1989

McCann, D.J., Weissman, A.D., Su, T.P.

Sigma-1 and sigma-2 sites in rat brain: comparison of regional, ontogenetic, and subcellular patterns.

Synapse., 17(3), 182-9

1994

McLean, S., Weber, E.

Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in guinea-pig brain.

Neuroscience, 25, 259-269

1988

Meldrum, L.A. Burnstock.

Evidence that ATP acts as a cotransmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens.

Eur. J. Pharmacol., 92, 161-166

1983

Mendelsohn, L.G., Kalra, V., Johnson, B.G., Kerchner G.A.

Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 233, 597-602

1985

Miranda, H.F., Wolstenholme, W.W., Moreu, G.M., Santiago, P.A.

Effects of haloperidol on neurotransmitter activity in the rat vas deferens.

Gen. Pharmac., 19 (1), 123-27

1988

Monnet, F.P., Debonnel, G., Bergeron, R., Gronier, B., de Montigny, C.

The effects of sigma ligands and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA3 dorsal hippocampus neurones are differentially affected by pertussin toxin.

Br. J. Pharmacol., 112(2), 709-15,

1994

Monyer, H., Choi, D.W.

Morphinans attenuate cortical neuronal injury induced by glucose deprivation in vitro.

Brain Res., 446, 144-48

1988

Mottram, D.R.

Agonist at presynaptic receptors on sympathetic nerves differentially affect two phases of the contractile response in the rat vas deferens.

Pharmacol. Res. Commun., 20(11), 963-973

1988

Musacchio, J.M., Klein, M., Canoll, P.D.

Dextromethorphan and sigma ligands: common sites but diverse effects.

Life Sci, 45, 1721-1732

1989

Musacchio, J.M., Klein, M., Canoll, P.D.

Dextromethorphan site, sigma receptors and the psychotomimetic effects of sigma opiates.

Prog. Clin. Biol. Res., 328, 13-16

1990

Okuyama, S., Imagawa, Y., Ogawa, S., Araki, H., Ajima, A., Tanaka, M., Muramatsu, M., Nakazato, A., Yamaguchi, K., Yoshida, M., Otomo, S.

NE-100, a novel sigma receptor ligand: in vivo tests

Life Sci., 53, PL 285-290

1993

Oliver, M.W., Shacklock, J.A., Kessler, M., Lynch, F., Baimbridge, K.G.

The glycine site modulates NMDA-mediated changes of intracellular free calcium in cultures of hippocampal neurons.

Neurosci, Lett. 114, 197-202

1990

Pechnick, R.N., George, R., Poland, R.E.

Characterization of the effects of the acute and repeated administration of MK-801 on the release of adrenocorticotropin, corticosterone and prolactin in the rat.

Eur. J. Pharmacol., 164, 257-263

1989a

Pechnick, R.N., George, R., Poland, R.E., Hiramatsu, M., Cho, A.K.

Characterization of the effects of acute and chronic administration of phencyclidine on the release of adrenocorticotropin, corticosterone and prolactin in the rat: Evidence for the differential development of tolerance.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 250, 534-540

1989b

Pechnick, R.N., Wong, C.A., George, R., Thurkauf, A., Jacobson, A.E., Rice, K.C.

Comparison of the effects of the acute administration of dexoxadrol, levoxadrol, MK-801 and phencyclidine on body temperature in the rat.

Neuropharmacology, 28, 829-835

1989c

Pekelmann, R., Avellar, M. C.W.

Effect of ageing on the number of neuronal noradrenaline uptake sites in the rat vas deferens.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 346, 405-409

1992

Pittaluga, A., Raitieri, M.

N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA) and Non-NMDA Receptors Regulating Hippocampal Norepinephrine Release. I. Location on Axon Terminals and Pharmacological Characterization.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 260, 1, 232-37.

1992

Pubill, D., Canudas, A.M., Gasulla, D., Pallàs, M., Escubedo, E., Camarasa, J.
MK-801 enhances noradrenergic neurotransmission in rat vas deferens.
Eur. J. Pharmacol., 303, 171-175
1996

Quirion, R., Chicheportiche, R., Contreras, P.C., Johnson, K.M., Lodge, D., Tam, S.W., Woods, J.H.,
Zukin, S.R.
Classification and nomenclature of phencyclidine and sigma receptor sites.
Trends Neurosci., 10, 444-446
1987

Quirion, R., Bowen, W.D., Itzhak, Y., Junien, J.L., Musacchio, J.M., Rothman, R.B., Su, T.P., Taylor, D.P.
A proposal for the classification of sigma binding sites.
Trends Pharmacol. Sci., 13(3), 85-6
1992

Rapp, P.R., Fanelli, R.F., McGuire, M., Rosenberg, R.A., Gallagher, M.
Alterations in [³H]desmethylimipramine binding in the aged rat brain: An in vitro autoradiographic
demonstration.
Neurosc. Lett., 79, 17-22
1987

Rehavi, M., Skolnick, P., Hulihan, B., Paul, S.M.
High affinity binding of [³H]desipramine to rat cerebral cortex: Relationship to tricyclic antidepressant-
induced inhibition of epinephrine uptake.
Eur. J. Pharmacol., 70, 597-599
1981

Reynolds, I.J.
Interactions between Zn²⁺ and spermidine on the NMDA receptor complex: clues to the mechanism of action
of 1,10-bis-(guanidino)decane and pentamidine.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 263, 632-638
1992

Reynolds, I.J., Murphy, S.N., Miller, R.J.
 [³H]-Labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid receptor complex from rat brain is enhanced by
glycine.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7744-77448
1987

Reynolds, G.P., Brown, J.E., Middlemiss, D.N.
 [³H]Ditolyguanidine binding to human brain sigma sites is diminished after haloperidol treatment.
Eur. J. Pharmacol., 194(2-3), 235-6
1991

Richelson, E., Nelson, A.
Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 230, 94-102
1984

Richelson, E., Pfenning, M.

Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: Most antidepressants selectively block norepinephrine uptake.

Eur. J. Pharmacol., 104, 277-286
1984

Rock, D.M., McDonald, R.L.

The polyamine spermine has multiple actions on N-methyl-D-aspartate receptor single-channel currents in cultured cortical neurons.

Mol. Pharmacol., 41, 83-88
1992

Rockhold, R. W., Surrent, R. S., Acuff, C. G., Zhang, T., Hoskins, B., Ho, I. K.

Antagonism of the toxicity of cocaine by MK-801: differential effects in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats.

Neuropharmacology, 31, 12, 1269-1277
1992

Rogers, C., Lemaire, S.

Characterization of (+)-[³H]-3-PPP and [³H]TCP binding sites in membrane preparations of bovine adrenal medulla.

Prog. Clin. and Biol. Res., 328, 133-136
1990

Rogers, C., Lemaire, S.

Role of the σ receptor in the inhibition of [³H]-noradrenaline uptake in brain synaptosomes and adrenal chromaffin cells.

Br. J. Pharmacol., 103, 1917-22.
1991

Rogers, C.; Lemaire, S.

Characterization of [³H]desmethylinipramine binding in bovine adrenal medulla: interactions with σ and (or) phencyclidine-receptor ligands.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 70, 1508-1514
1992

Rothman, R.B.

PCP Site 2: A High Affinity MK-801-Insensitive Phencyclidine Binding Site.

Neurotoxicol Teratol 16(4), 343-353
1994

Rothman, R.B., Reid, A.A., Monn, J.A., Jacobson, A.E., Rice, K.C.

The psychotomimetic drug, phencyclidine, labels two high-affinity binding sites in guinea pig brain: evidence for NMDA-coupled and dopamine reuptake carrier associated PCP binding sites.

Mol. Pharmacol., 36, 887-896
1989

Sallés, J., Badia, A.

Modulation of α_1 -adrenoreceptors and functional consequences in the bisected rat vas deferens following chronic inhibition of neuronal noradrenaline uptake.

Br. J. Pharmacol., 108, 678-83

1993

Sammet, S., Graefe, K.H.

Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and sodium in neuronal uptake: kinetic evidence for co-transport.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 309, 99-107

1979

Sánchez-Armás, S., Orrego, F.

A major role for Cl⁻ in [³H]noradrenaline transport by rat heart adrenergic nerves.

Life Sci., 20, 1829-1838

1977

Schlyer, D.J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, L.F., Shiue, C.Y., Dewey, S.L., Bendriem, B., Logan, R., Raulli, R.

Regional distribution and kinetics of haloperidol binding in human brain: PET study with [¹⁸F]haloperidol.

Synapse., 11(1), 10-9

1992

Schoepp, D.D., Conn, P.J.

Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology.

Trends Pharmacol. Sci., 14, 13-20

1993

Schoepp, D.D., Johnson, B.G., True, R.A., Monn, J. A.

Comparison of (1S,3R)-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S, 3R-ACPD)- and 1R,3S-ACPD-stimulated brain phosphoinositide hydrolysis

Eur. J. Pharmacol.- Mol. Pharmacol. Sect., 207, 351-353

1991

Shibuya, H., Mori, H., Toru, M.

Sigma receptors in schizophrenic cerebral cortices

Neurochem. Res., 17(10), 983-90

1992

Shindou, T., Watanabe, S., Yamamoto, K., Nakanishi, H.

NMDA receptor-dependent formation of long-term potentiation in the rat medial amygdala neuron in an in vitro slice preparation.

Brain Res. Bull., 31, 667-672

1993

Shibley, R.E., Tilden, J.H.

A pithed rat preparation suitable for assaying presor substances.

Proc. Soc. Exp. Biol.(NY), 64, 453-455

1947

Shirayama, Y., Nishikawa, T., Umino, I. A., Takahashi, K.

p-Chlorophenylalanine-reversible reduction of sigma binding sites by chronic imipramine treatment in rat brain.

Eur. J. Pharmacol., 237(1), 117-26

1993

Sircar, R., Nichtenhauser, R., Ieni, J.R., Zukin, S.R.

Characterization and autoradiographic visualization of (+)-[³H]-SKF 10,047 binding in rat and mouse brain: further evidence for phencyclidine/"sigma-opiate" receptor commonality.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 237, 681-688

1986

Slater, P., Crossman, A.R., Sambrook, M.A.

Autoradiographic demonstration of binding sites of [³H]desipramine in the rat brain.

Neurosci. Lett., 31, 259-263

1982

Smith, R.C.; Meltzer, H.Y.; Arora, R.C.; Davis, J.M.

Effects of phencyclidine on [³H]catecholamine and [³H]serotonin uptake in synaptosomal preparations from rat brain.

Biochem. Pharmacol., 26, 1435-39

1977

Sneddon, P., Westfall, D.P.

Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in guinea pig vas deferens

J. Physiol., 347, 569-580

1984

Snell, L. D., Yi, S. J., Johnson, K. M.

Comparison of the effects of MK-801 and phencyclidine on catecholamine uptake and NMDA-induced norepinephrine release.

Eur. J. Pharmacol., 145, 223-226

1988

Speciale, C., Facheris, L., Fariello, R.G.

Tetrodotoxin reveals action of spermine at presynaptic N-methyl- D-Aspartate receptor.

Eur. J. Pharmacol., 214, 107-109

1992

Sprengel, R., Seeburg, P.H.

The unique properties of glutamate receptor channels.

FEBS Lett., 325, 90-94

1993

Steinberg, G.K., Saleh, J., Kunis, D.

Delayed treatment with dextromethorphan and dextrorphan reduces cerebral damage after transient focal ischemia.

FEBS Lett., 325, 90-94

1988

- Steinberg, G.K., Saleh, J., Kunis, D., de la Paz, R., Zarnegar, R.
Protective effect of N-methyl-D-aspartate antagonists after focal cerebral ischemia in rabbits.
Stroke., 20, 1247-52
1989
- Su, T.P.
Sigma receptors, putative links between nervous, endocrine and immune systems.
Eur. J. Biochem., 200, 633-642
1991
- Suzdak, P.d., Sheardown, M.J., Honore, T.
Characterization of the metabotropic glutamate receptor in mouse cerebellar granule cells: lack of effect of 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulphamoylbenzo(F)-quinoxaline (NBQX).
Eur. J. Pharmacol.-Mol Pharmacol. Sect., 245, 215-220
1993
- Takazawa, A., Anderson, P., Abraham, W.C.
Effects of dextromethorphan, a non-opioid antitussive, on development and expression of amygdaloid kindled seizures.
Epilepsia (Basel), 31, 496-502
1990
- Tam, S.W.
Naloxone-inaccessible sigma receptor in rat central nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 6703-6707
1983
- Tam, S.W., Cook, L.
Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[³H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5618-5621
1984
- Thompson, A.M., West, D.C., Lodge, D.
An NMDA receptor mediate synapse in rat cortex a site of action of ketamine.
Nature (London), 313, 479-484
1985
- Tortella, F.C., Martin, D.A., Allot, C.P., Steel, J.A., Blackburn, T.P., Loveday, P., Russell, N.J.
Dextromethorphan attenuates postischemic hypoperfusion following incomplete global ischemia in the anesthetized rat.
Brain Res., 482, 179-83
1989b
- Tortella, F.C., Pellicano, M., Bowery, N.G.
Dextromethorphan and neuromodulation: Old drug coughs up new activities.
Trends. Pharmacol. Sci., 10., 501-7
1989a

- Tosk, J.M., Hinshaw, D.B., Will, A.D., Bozzetti, L.P., Hoishouser, B.A.
An in vivo proton MR spectroscopic study of patients with Parkinson's disease: Evidence for glutamate-mediated excitotoxicity.
Soc. Neurosci. Abst., 20, 630
1994
- Tricklebank, M.D., Singh, L., Oles, R.J., Preston, C., Iversen, S.D.
The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor.
Eur. J. Pharmacol., 167, 127-135
1989
- Tsumoto, T.
Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of "forgetting" that should not be forgotten.
Neurosci. Res., 16, 263-270
1993
- Ungell, A. L., Bönisch, H., Graefe, K. H.
Choline⁺: A substrate of the neuronal noradrenaline carrier in the rat vas deferens.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 334, 223-227
1986
- Ungell, A. L., Oberleithner, H., Graefe, K. H.
Chloride-dependence of the potency of the inhibitors of the neuronal noradrenaline carrier in the rat vas deferens.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 339, 65-70
1989
- Varga, V., Janaky, R., Holopainen, I., Saransaari, P., Oja, S.S.
Effect of magnesium on calcium influx activated by glutamate and its agonists in cultured cerebellar granular cells.
Neurochem. Res., 17, 1195-1200
1992
- Vaupel, D.B., Su, T-P.
Guinea-pig vas deferens preparation may contain both σ receptors and phencyclidine receptors.
Eur. J. Pharmacol., 139, 125-28
1987
- Vazquez, M.L., Garland, D.J., Sun, E.T., Cler, J.A., Mick, S.J., Hood, W.F., Monahan, J.B., Iyengar, S., Rao, T.S.
Characterization of 3-carboxy-5-phosphono-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (SC-48981), a potent competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist in vitro and in vivo.
Neurosci. Lett., 135, 149-152
1992
- Vignon, J., Lazdunski, M.
Structure-function relationships in the inhibition of synaptosomal dopamine uptake by phencyclidine and analogues: potential correlation with binding sites identified with [³H]phencyclidine.
Biochem. Pharmacol., 33, 700-02
1984

Vignon, J., Pinet, V., Cerruti, C., Kamenka, J.M., Chicheportiche, R.
[³H]N-[1-(2benzo(b)thiophenyl)cyclohexyl]piperidine ([³H]BTCP): a new phencyclidine analog selective for the dopamine uptake complex.
Eur. J. Pharmacol., 148, 427-36
1988

Vignon, J., Privat, A., Chadieu, T., Thierry, A., Kamenka, J.M.
[³H]-Thienyl-phencyclidine ([³H]-TCP) binds to two sites in rat brain. Localization by autoradiographic and biochemical techniques.
Brain Res., 378, 133-141
1986

Walker, J.M.; Bowen, W.D.; Walker, F.O.; Matsumoto, R.R.; De Costa, B.; Rice, K.C.
Sigma receptors: Biology and function.
Pharmacol. Rev., 42, 355-402
1990

Wander, T.J.; Nelson, A.; Okazaki, H.; Richelson, E.
Antagonism by antidepressants of serotonin 5₁ and 5₂ receptors of normal human brain in vitro.
Eur. J. Pharmacol., 132, 115-121
1986

Watkins, J.C., Evans, R.H.
Excitatory amino acid transmitters.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21, 165-204
1981

Weber, E., Sonders, M., Quarum, M., McLean, S., Pou, S., Keana, J. F. W.
1,3-di(2-[5-³H]tolyl)guanidine: a selective ligand that labels sigma-type receptors for psychomimetic opiates and antipsychotic drugs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 8784-8788
1986

Wedzony, K.; Golembiowska, K.
Concomitant administration of MK-801 and desipramine enhances extracellular concentration of dopamine in the rat prefrontal cortex.
NeuroReport, 5, 75-7
1993

Watson, S., Girdlestone, D.
Receptor and ion channel nomenclature supplement.
Trends Pharmacol. Sci. (Supl.)
1995

Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A., Molinoff, P.B.
Minireview: modulation of the NMDA receptor by polyamines.
Life Sci., 48, 469-498
1991

- Wolfe, S.A., JR., Culp, S.G., De Souza, E.B.
Sigma receptors in endocrine organs: identification and characterization and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary.
Endocrinology., 124, 1160-1172
1989
- Wong, D.T., Bymaster, F.P.
Effect of nisoxetine on uptake of catecholamines in synaptosomes isolated from discrete regions of rat brain.
Biochem. Pharmacol., 25, 1979-1983
1976
- Wong, D.T., Threlkeld, P.G., Best, K.L., Bymaster, F.P.
A new inhibitor of norepinephrine uptake devoid of affinity for receptors in rat brain.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 222, 61-65
1982
- Wong, E.H., Kemp, J.A., Priestley, T., Knight, A.R., Woodruff, G.N., Iversen, L.L.
The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 7104-7108
1986
- Wong, B.Y., Coulter, D.A., Choi, D.W., Prince, D.A.
Dextrorphan and dextrometorphan, common antitussives, are antiepileptic and antagonize N-methyl-D-aspartate in brain slices.
Neurosci. Lett., 85, 261-66
1988
- Worrall, D. M., Williams, D. C.
Sodium ion-dependent transporters for neurotransmitters: a review of recent developments.
Biochem. J., 297, 425-36.
1994
- Yamamoto, H., Yamamoto, M., Sagi, N., Klenerová, V., Goji, K., Kawai, N., Baba, A., Takamori, E., Moroji, T.
Sigma Ligands Indirectly Modulate the NMDA Receptor-Ion Channel Complex on Intact Neuronal Cells via σ -1 Site
J. Neurosci., 15 (1), 731-736
1995
- Zeitner, C. J., Graefe, K. H.
Sodium-dependence of the potency of inhibitors of the neuronal noradrenaline carrier in the rat vas deferens.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 334, 397-402
1986
- Zorumski, C.F., Thio, T.T.
Properties of vertebrate glutamate receptors: calcium mobilization and desensitization.
Prog. Neurobiol., 39, 295-336
1992

BIBLIOGRAFÍA

Zukin, S.R., Brady, K.T., Silfer, B.L., Balster, R.L.
Behavioral and biochemical stereoselectivity of sigma opiate/PCP receptors.
Brain Res., 294, 174-177
1984

Zukin, S.R., Tempel, A., Gardner, E.L., Zukin, R.S.
Interaction of [³H](-)-SKF-10,047 with brain sigma receptors: characterization and autoradiographic
visualitization.
J. Neurosci., 46, 1032-1041
1986