



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

CAPACIDAD PROFILACTICA DE ALGUNOS CALCIO  
ANTAGONISTAS EN EL BRONCOESPASMO INDUCIDO  
CON ALTO POTASIO, HISTAMINA Y CARBACOL

## Tesis Profesional

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

*Martha Patricia Navarro Huerta*

T

RC6

.C3

N3

c.1



1080077135



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

Q.F.B.  
Nº 2 c  
19

CAPACIDAD PROFILACTICA DE ALGUNOS CALCIO  
ANTAGONISTAS EN EL BRONCOESPASMO INDUCIDO  
CON ALTO POTASIO, HISTAMINA Y CARBACOL

## Tesis Profesional

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

*Martha Patricia Navarro Huerta*

T  
RC684  
C34  
N3



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO PRESENTA:

MARTA PATRICIA NAVARRO FUERTA.

TITULO: CAPACIDAD PROFILACTICA DE ALGUNOS CALCIO  
-----  
ANTAGONISTAS EN EL BRONCOESPASMO INDUCIDO  
-----  
CON ALTO POTASIO, HISTAMINA Y CARBACOL.  
-----

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN ROBERTO VALLE AGUILERA.

DEPTO DE FISILOGIA Y FARMACOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA, U.A.S.L.P.

A MIS PADRES Y HERMANOS

CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO  
AL DR JUAN ROBERTO VALLE AGUILERA,  
JEFE DEL DEPTO. DE FARMACOLOGIA Y  
FISIOLOGIA DE LA ESCUELA DE MEDICINA  
DE LA U.A.S.L.P., DIRECTOR DE ESTA  
TESIS.

A LA DRA. BEATRIZ J VELASQUEZ CASTILLO  
CON AGRADECIMIENTO Y RESPETO.

# I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION.....	1
GENERALIDADES.....	8
METODOS .....	15
ANALISIS DE RESULTADOS. ....	27
RESULTADOS . . . . .	28
DISCUSION .....	54
CONCLUSIONES.. ..	64
BIBLIOGRAFIA.....	68

## INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

	PAGINA:
FIGURA " A " .....	11
FIGURA " B " .....	12
FIGURA " C " .....	18
TABLA I Y II .....	26
GRAFICAS 1, 2 Y 3 .....	34
GRAFICAS 4, 5 Y 6 .....	36
GRAFICAS 7, 8 Y 9 .....	38
TABLA III Y IV .....	39
GRAFICAS 10, 11 Y 12 .....	44
GRAFICAS 13, 14 Y 15 .....	46
GRAFICAS 16, 17 Y 18 .....	48
GRAFICAS 19, 20 Y 21 .....	50
GRAFICAS 22, 23 Y 24 .....	52
TABLA V .....	53
TABLA VI .....	61
TABLA VII .....	65

I N T R O D U C C I O N

## I N T R O D U C C I O N

El descubrimiento de los Calcio bloqueadores ha permitido un gran avance en el tratamiento terapéutico de padecimientos relacionados con procesos de espasmos del músculo liso como en el caso de la Angina de pecho y de la Hipertensión sistémica.

Uno de los beneficios de los Calcio bloqueadores radica en la prevención de la vasoconstricción o bien en la inducción de la vasodilatación.

El vasoespasmo es considerado como una respuesta contráctil exagerada del tejido muscular liso. Porque la activación de la maquinaria contráctil del músculo de vías aéreas, el de las arterias coronarias y el de la mayoría de los vasos son dependientes del Calcio libre en el mioplasma celular, esta situación es en buena parte regulada por la entrada del ión Calcio a la célula. De modo que el efecto relajante de los Calcio bloqueadores se lleva a cabo directamente sobre este tejido. De ahí el interés de investigar el efecto de los Calcio bloqueadores en estados tales como el broncoespasmo en padecimientos como el Asma, el cual es considerado en la mayor parte de los casos como un evento reversible de la obstrucción de vías aéreas.

Tal obstrucción es el resultado de la activación de varias respuestas celulares como lo pueden ser: La activación simultánea de las células del músculo liso, de las cebadas, de las secretoras mucosas, y de las neuronas del nervio vago, así

como también células que se producen durante reacciones inflamatorias en las que intervienen los eosinófilos. Por todo lo anterior se puede pensar que no únicamente las células musculares lisas son capaces de producir el broncoespasmo sino que pueden ser todas en conjunto o sólo algunas de ellas, lo que dificulta aún más la evaluación del papel del Calcio en los procesos de obstrucción, ya que todas estas células requieren para su activación de reacciones dependientes de la translocación del Calcio del medio extracelular al medio intracelular. (Mongar JI, Schild HO, 1958).

Con todo esos antecedentes, numerosos agentes se han desarrollado o están en vías de producción para prevenir el flujo del ión Calcio del medio extracelular e intracelular a la matriz citoplasmática. Aunque el mecanismo de acción de algunos agentes no está aún bien definida, hay evidencia que pudieran ser efectivos en la prevención tanto del espasmo del músculo liso como en la liberación de mediadores químicos de células cebadas que son también responsables de la contracción muscular.

Los movimientos del Calcio a través de la membrana celular están asociadas con reacciones celulares como las descritas del modo siguiente: las células musculares lisas las cuales son excitadas sufriendo mas tarde una contracción, las cebadas que al ser activadas secretan mediadores químicos, al igual que las células glandulares secretoras, y los eosinófilos que se encuentran presentes en gran cantidad en el área de obstrucción o inflamación y que ahí se acumulan por mecanismos de Quimiotaxis.

Se han identificado varios canales para el flujo de iones en las células musculares lisas. Uno es el canal rápido relacionado principalmente con el flujo de iones como el Sodio. Este canal no parece ser afectado de manera importante por los Calcio bloqueadores disponibles en la actualidad.

Otro canal, llamado canal lento, es más específico para el movimiento de Calcio dentro de la célula, en el canal hay sitios receptores específicos para iones de cierto radio y cargas eléctricas determinadas, que lo hacen selectivo a Calcio. (Carafoli E 1978, Orr TSC, 1973).

Uno de los Calcio bloqueadores o antagonistas del Calcio que se ha empleado en el tratamiento del Asma es el Cromoglicato de sodio, el cual se administra por inhalación y parece funcionar específicamente en la prevención de la liberación de mediadores de las células cebadas, por lo que posiblemente causa una disminución del movimiento del Calcio a través de un canal dependiente de mediador o receptor hacia el interior de la célula muscular lisa (Altounyan REC, 1967).

Hace relativamente poco tiempo 1964-1967 se descubrieron un grupo de drogas tales como la Nifedipina, Verapamil y Diltiazem empleadas hoy principalmente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Estas drogas fueron designadas como Calcio bloqueadores, debido a que ejercen su acción específicamente bloqueando el canal lento (Fleckenstein, 1983).

Posteriormente en los años 1967-1969 Albrecht Fleckenstein elaboró una clasificación de los Calcio antagonistas

en relación a su potencia y especificidad, el orden en que quedaron fue el siguiente:

#### G R U P O " A "

Dentro de este grupo están Calcio antagonistas, capaces de inhibir en un 90 % el acople entre la Excitación y la Contracción en el Miocardio ventricular de los mamíferos, antes de que se vea afectado el flujo de sodio juzgado esto por la depresión de la fase inicial del potencial de acción. A este grupo pertenecen:

Nifedipina

Ryosidina

Verapamil

D 600

Diltiazem.

#### G R U P O " B "

Este grupo de Calcio antagonistas es menos potente y específico que los del grupo " A ". Están incluidas dentro de este segundo grupo sustancias como:

Prenylamina

Fendilina

Terolidina

Perhexilina

## Caroverina.

Las cuales son menos potentes y específicas debido a que además inhiben procesos de excitación dependientes del Sodio. Por esta razón la acción a las dosis terapéuticas que este grupo de Calcio antagonistas ejerce es prácticamente insignificante en comparación con las dosis terapéuticas del grupo " A " (A. Fleckenstein, 1978, 1979, 1983).

Otros estudios recientes (Greenwood C, 1982) han demostrado que la Nifedipina y en forma más significativa el Verapamil es capaz de bloquear el espasmo bronquial inducido por el ejercicio, siendo bastante seguro su empleo; uno de los efectos secundarios es la Hipotensión que puede presentarse cuando se han administrado dosis relativamente altas y en forma prolongada.

En el Pasado era un dilema para el médico el tratamiento que debían seguir los pacientes que sufrían Angina de pecho y Asma simultáneamente, debido a que el medicamento disponible más potente para la Angina de pecho era la Nitroglicerina y más tarde los Bloqueadores Beta-adrenérgicos, pero éstos están contraindicados en presencia de Asma, mientras que los estimulantes Beta-adrenérgicos eran empleados frecuentemente en el Asma y tienen efectos indeseables sobre el aparato cardiovascular.

En la actualidad con la introducción de los Calcio bloqueadores, está a disposición de los médicos y pacientes una nueva clase de drogas para el tratamiento de la Angina de pecho y otras enfermedades cardiovasculares.

Debido al amplio margen de seguridad que tienen los Calcio bloqueadores y aparente efectividad como agentes profilácticos del espasmo del músculo liso vascular, es en la actualidad un área de estudio prometedora para la prevención y tratamiento del espasmo de vías aéreas.

Es por tanto el interés de este trabajo, investigar el mecanismo celular y subcelular mediante el cual los Calcio antagonistas desacoplan la excitación de la contracción en las células musculares que participan en el broncoespasmo. Asimismo determinar hasta que punto los Calcio antagonistas pueden intervenir en la prevención de el broncoespasmo inducido por agentes que normalmente se liberan durante el estado de anafilaxia tales como: Histamina, Serotonina, Acetilcolina y sustancias de reacción lenta.

Como punto final y consecuencia de este trabajo se investigaron y determinaron las dosis terapéuticas idóneas en procesos broncoespasmódicos y se les comparó con las concentraciones (DOSIS) a las cuales esas drogas funcionan como antianginosos y antihipertensores.

**G E N E R A L I D A D E S**

## GENERALIDADES

La contracción del músculo liso depende de la cantidad de ión Calcio libre dentro de la célula (Bolton 1979; Ebashi 1980) la concentración intracelular del Calcio libre durante el reposo es de aproximadamente  $1E-7$  M o más pequeña, mientras que la concentración extracelular está en el orden de  $1E-3$  M (O. Doherty et al, 1980) por lo que existe un gradiente de concentración para iones Calcio hacia el interior de la célula.

Por otra parte, la permeabilidad de la membrana celular al Calcio es muy baja por lo que la entrada del catión al citoplasma es muy pequeña para que resulte suficiente para iniciar la contracción.

Cuando la concentración del Calcio extracelular se eleva 100 veces por encima de la concentración basal o sea, aproximadamente  $5E-6$  M o  $1E-5$  M se inicia la secuencia bioquímica dentro de la célula lográndose a fin de cuentas la contracción del músculo en cuestión.

Las proteínas responsables de la contracción en el músculo liso son la Actina y la Miosina (figura B) las cuales forman filamentos finos y gruesos respectivamente, unidos mediante puentes transversales, los cuales no se forman cuando la célula muscular está en reposo y los filamentos pueden deslizarse libremente.

Cuando la concentración de Calcio intracelular alcanza un nivel crítico (aproximadamente  $1E-6$  M) este se une a

la calmodulina para formar el complejo Calcio-calmodulina que es capaz de iniciar la actividad biológica de diferentes proteínas muchas de ellas enzimas como la Ca-Mg ATPasa (Dabrowska et al., 1977; Adelstein & Klee, 1981).

El proceso de excitación - contracción en el músculo se efectúa principalmente por la movilización del Calcio intracelular y extracelular entre otros factores (Ticku & triggle 1976, Bolton 1979).

Los eventos involucrados en el acople excitación-contracción y la homeostasis del músculo liso de vías aéreas se ilustra en la figura A y B.

Existe suficiente evidencia experimental de que la entrada del Calcio extracelular a la célula puede ocurrir mediante dos vías:

- 1.- Mediante los canales de Calcio sensibles a Potencial (CCSP, 1 en la figura A).

- 2.- A través de los canales de Calcio sensibles a Receptor (CCSR, 2 en la figura A) situados en la membrana plasmática (Bolton 1979, Meisheri et al 1981).

Después de la entrada del ión Calcio a la célula, éste se une a la Calmodulina formándose el complejo Calcio-calmodulina el cual activa las cadenas ligeras de Miosina llevándose a cabo su fosforilación, la Miosina ya fosforilada se une a otra proteína contráctil, la Actina formándose entre ellas puentes transversales, originándose de esta forma la contracción en el músculo liso.

La homeostasis del Calcio intracelular es regulada

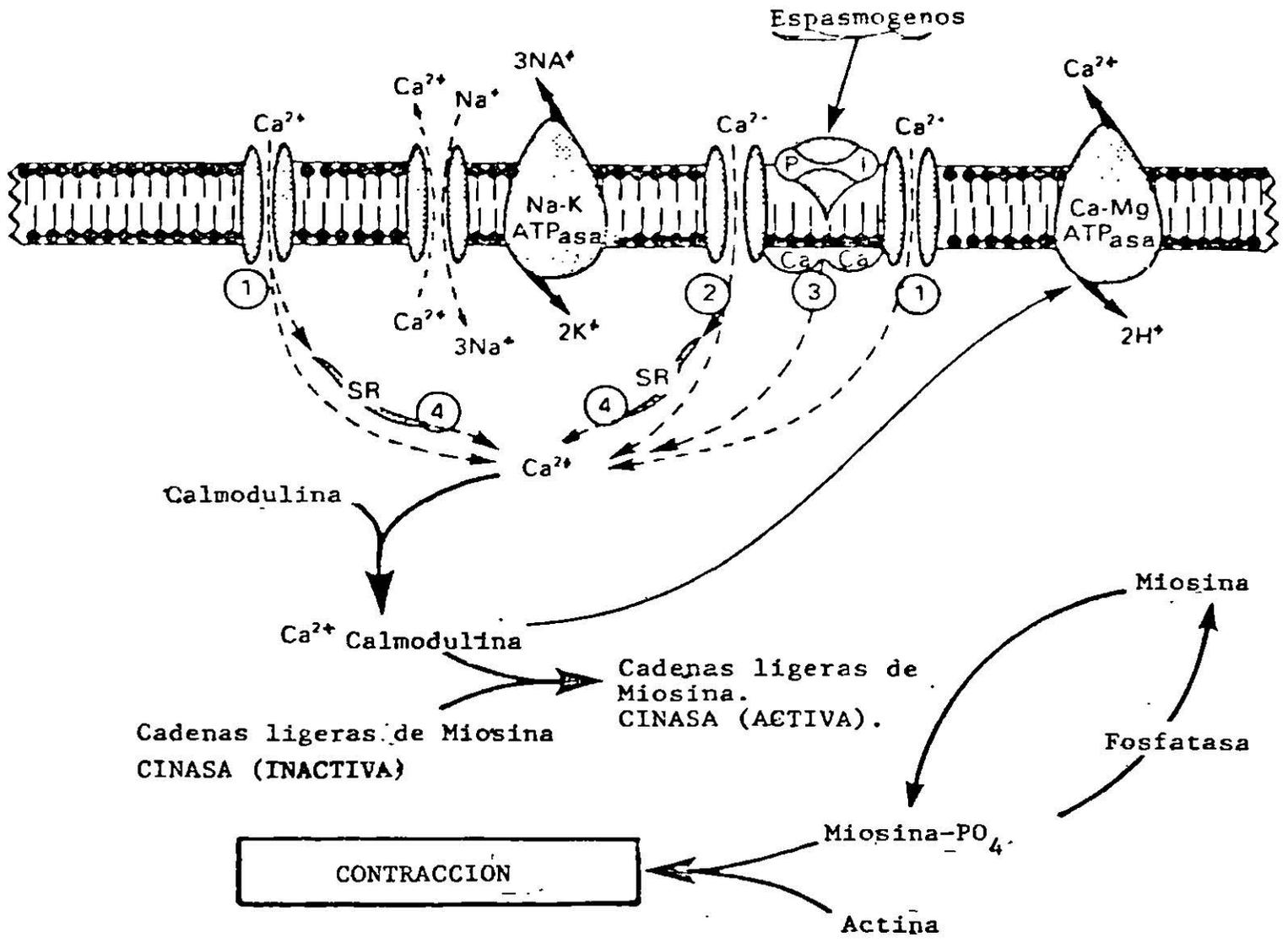
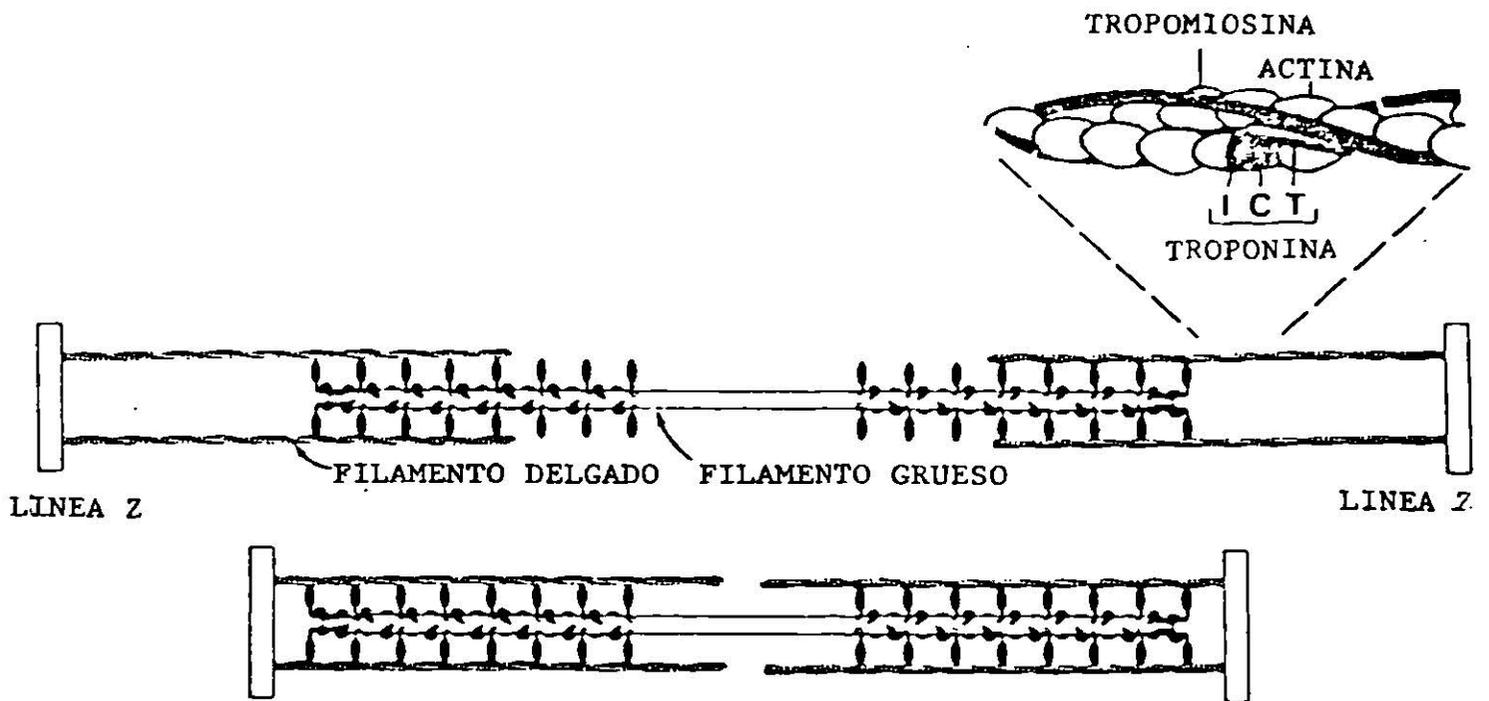


FIGURA " A "

Representación de los eventos envueltos en el acople EXCITACION-CONTRACCION y Homeostasis del ión Calcio intracelular en el músculo liso de vías aéreas.

- 1.- Canales de Calcio sensibles a Potencial.
- 2.- Canales de Calcio sensibles a Receptor.
- 3.- Activación de la liberación de Calcio intracelular.
- 4.- Liberación de Calcio que se encuentra dentro del

retículo sarcoplásmico.



F I G U R A " B "

Representación de los filamentos de las proteínas envueltas en el mecanismo de CONTRACCION del músculo liso, ACTINA y MIOSINA.

por el recambiador electrogénico  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  en el que el flujo de Calcio depende directamente del gradiente de  $\text{Na}^+$  y el flujo de la bomba de Calcio (Ca-Mg-ATPasa) puede ser estimulado por espasmógenos como la Acetilcolina, 5-Hidroxitriptamina, Histamina, Leucotrienos, Prostaglandinas y agonistas alfa, lo cual produce movimientos intracelulares de el ión Calcio activándose de esta forma la calmodulina y formándose el complejo Calcio-Calmodulina el cual induce la activación de las cadenas ligeras de Miosina.

Los canales sensibles a voltaje se abren debido a la interacciones de ciertos espasmógenos (incluyendo las soluciones despolarizantes de KCl) con receptores específicos de membrana que reducen el potencial del sarcolema, de modo que en ciertos músculos lisos tal despolarización puede generar un potencial de acción (Bolton 1979, Daniel et al 1983).

En las células del músculo liso traqueal se establece un potencial de reposo entre -48 mv y -60 mv y no presentan potenciales de acción espontáneos (Kirk Patrick 1975, 1981; Coburn & Yamaguchi, 1977 Farley & Miles, 1977; Coburn, 1979; Foster et al 1983).

Se ha observado que el Tetraetilenamonio puede inhibir la conductancia a Potasio y de esta manera puede inducir potenciales espontáneos en pico. Este efecto no se ha observado con soluciones despolarizantes de KCl (Mc Caing & Souhrada, 1980; Small, 1982; Dixon & Small, 1983; Foster et al 1984).

Estudios in vitro apoyan la existencia de dos tipos de canales de Calcio en los que su apertura depende de

diferentes espasmógenos y de la concentración extracelular de Calcio.

Dichos estudios también confirman la existencia de depósitos de Calcio intra y extracelulares demostrándose que los espasmógenos que utilizan Calcio de compartimientos extracelulares son más sensibles a reducciones en la concentración de Calcio externo.

Estos experimentos fueron hechos en preparaciones de bovinos, caninos, cobayos y humanas en las cuales se indujo la contracción mediante una solución despolarizante de KCl y se observó que son más sensibles a reducciones en las concentraciones de Calcio que aquellas inducidas con 5 Hydroxitriptamina, Histamina, Acetilcolina, Metacolina, Leucotrienos C4 y D4.

La prevención y/o alivio del broncoespasmo está asociado con el control de la cantidad de Calcio dentro de la célula, dicho control puede llevarse a cabo mediante varias maniobras:

- 1.- La inhibición transmembranal del flujo de Calcio desde compartimientos extracelulares.
- 2.- La inhibición de la activación de la Calmodulina.
- 3.- La inhibición de la liberación de Calcio intracelular.
- 4.- El aumento de procesos de secuestro de Calcio libre.
- 5.- La inhibición de la secuencia bioquímica primaria para la interacción de Actina y Miosina.

Se piensa que las drogas bloqueadoras de los canales de Calcio son activadas por mecanismos dependientes de

AMPC. Drogas como el Verapamil y Diltiazem forman un grupo de Calcio bloqueadores mientras que otro está formado por las Dihidropiridinas representadas por la Nifedipina que podrá ser utilizada en forma segura en el tratamiento de varias patologías cardiovasculares. Sin embargo a excepción del asma inducida por el ejercicio hay poca evidencia convincente de que estas drogas bloqueadoras de los canales Calcio inhiben la broncoconstricción inducida por una gran variedad de espasmógenos lográndose esto sólo a altas concentraciones plasmáticas.

M E T O D O S

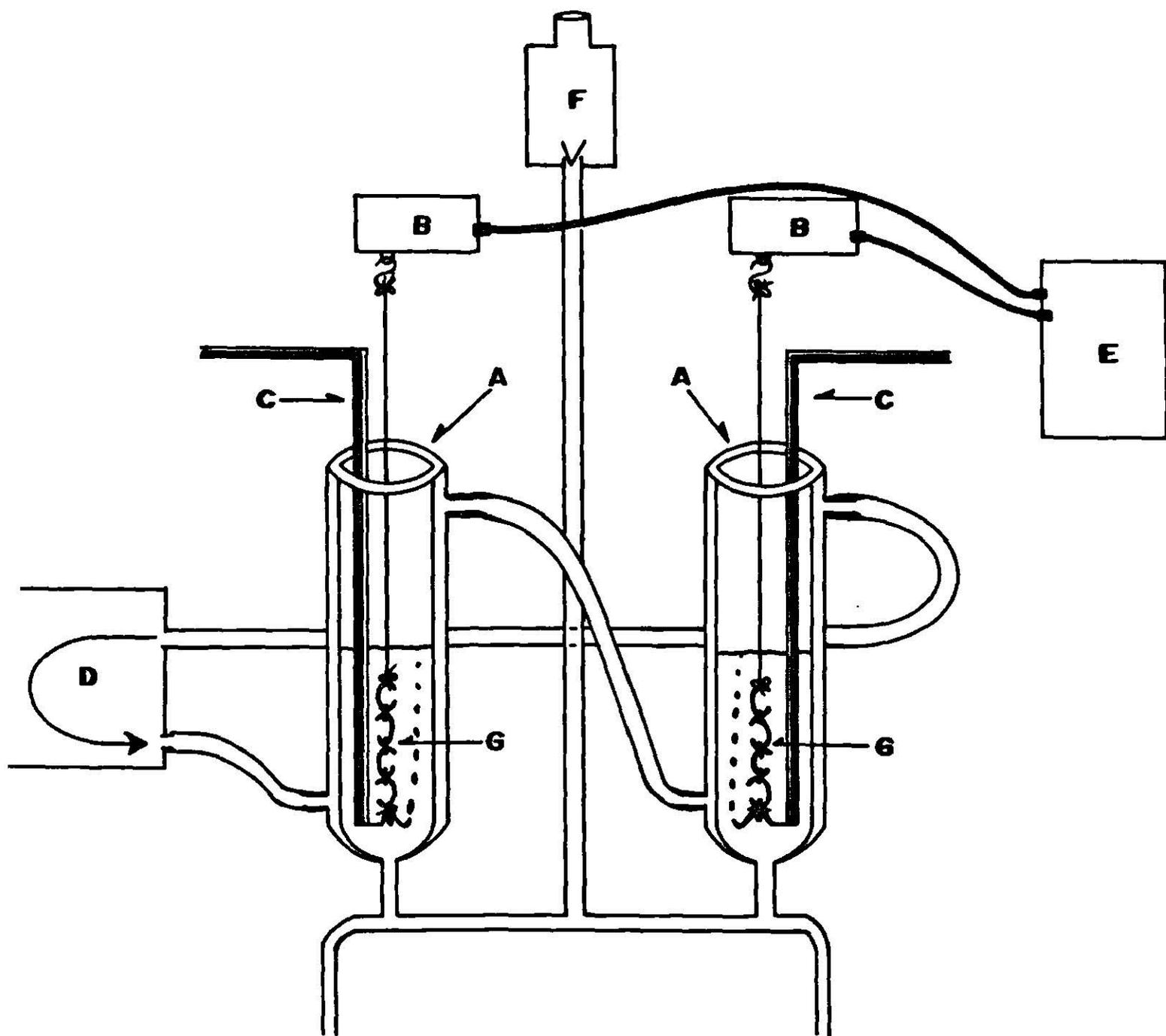
## M E T O D O S

Para el presente trabajo se seleccionaron Cobayos hembras o machos de un peso entre 400-500 gramos. Los animales se sacrificaron sometiéndolos a inhalar éter, dentro de un frasco cerrado. Después se colocaron sobre una mesa de disección, se limpió perfectamente el tórax y se abrió capa por capa hasta llegar a la tráquea, la que se cortó desde el extremo inferior de la laringe hasta la bifurcación de los bronquios.

Posteriormente ésta se limpió de tejido conectivo y grasa colocándola en una caja de Petri con solución de Krebs (con un pH de 7.4 y a una Osmolaridad de 300 miliosmolas) procediendo a cortarla en forma transversal para obtener 16 anillos con los que se formaron 4 cadenas de 4 anillos cada una como se muestra en la figura C (G).

En seguida se amarraron de un extremo a un pato de vidrio y se cortaron todos los anillos de la cadena por el lado del cartilago, según fue descrito por Akacusa en 1952. Después se sumergieron en un baño para órgano aislado que contiene solución de Krebs y se amarraron del otro extremo a un transductor isométrico FT03 conectado a su vez a un Poligrafo Grass, como se muestra en la figura C.

En el baño se hizo burbujear gas con 95 % de oxígeno y un 5 % de Bióxido de Carbono, manteniéndose a una temperatura de 38 grados centígrados en forma constante. Cuando las preparaciones están colocadas en el dispositivo experimental



- A.- BAÑO PARA ORGANO AISLADO
- B.- TRANSDUCTOR ISOMETRICO
- C.- PATO PARA BURBUJEO
- D.- BOMBA TEMPERATURA CONSTANTE
- E.- POLIGRAFO GRASS
- F.- BOTELLA DE KREBS
- G.- CADENA DE CUATRO ANILLOS TRAQUEALES

FIGURA " C "

se les dejó 2 horas para que se estabilizara, aplicándoles una carga de 2 gramos para que los elementos elásticos del tejido se estiren y no se enmascaren o amortigüe la actividad mecánica contráctil.

La composición de la solución de Krebs-Henseleit fue la siguiente:

	mM / lt.
Cloruro de Sodio	130.0
Cloruro de Potasio	4.7
Sulfato de Magnesio	1.17
Bicarbonato de Sodio	14.9
Fosfato diácido de Potasio	1.19
Cloruro de Calcio	1.1
Dextrosa	27.7

Todos los componentes para la preparación de la solución de Krebs-Henseleit se tomaron de soluciones Stock de las siguientes concentraciones:

Cloruro de Sodio	2 M
Cloruro de Potasio	2 M
Sulfato de Magnesio	0.25 M
Bicarbonato de sodio	1 M
Fosfato diácido de Potasio	10 %
Cloruro de Calcio	0.5 M

Tomando en cuenta la disociación de cada sustancia la solución así preparada tiene una osmolaridad de aproximadamente 300 miliosmolas, y es isotónica con el plasma del mamífero, con un pH inicial de 7.85 el cual es corregido a un pH de 7.4 mediante el burbujeo de 95 % de Oxígeno y 5% de Bióxido de Carbono.

Las drogas utilizadas son:

A) Drogas agonistas utilizadas para inducir la contracción en el músculo liso traqueal:

1.- Clorhidrato de Histamina.

Esta sustancia está almacenada normalmente en las células cebadas, mastocitos y basófilos y tiene una poderosa acción broncoconstrictora sobre el músculo liso traqueal de cobayo.

Peso molecular: 184.1 grs/mol (Compañía Química Sigma). De esta sustancia se prepara un stock de  $1.62E-3$  M, (disolviendo 10 mgs. de Clorhidrato de Histamina en 20 mls. de agua destilada). De esta solución se tomarán diferentes volúmenes que correspondan a las concentraciones requeridas durante el experimento.

2.- Clorhidrato de Carbacol.

Peso molecular: 182.7 grs/mol (Compañía Química Sigma). Se preparó un Stock de  $2.73E-3$  M (se disuelven 10 mgs.

de Clorhidrato de Carbacol en 20 mls. de solución de Krebs) para tomar diferentes volúmenes que correspondan a las concentraciones requeridas para el experimento.

### 3.- Cloruro de Potasio.

Peso molecular: 74.5 grs/mol (Compañía Química Merck).  
Se prepara un stock de una concentración 2 M (se disuelven 74.5 grs. de Cloruro de Potasio en un litro de agua destilada) para tomar diferentes volúmenes que correspondan a las concentraciones requeridas para el experimento.

Todas estas sustancias a excepción de Cloruro de Potasio deben ser preparadas horas antes del experimento para contar con soluciones frescas.

Los volúmenes de las soluciones anteriores, usadas durante el experimento son del orden de los microlitros y por tanto la alteración de la osmolaridad del baño es insignificante.

B).- Drogas utilizadas para inducir la relajación del músculo liso traqueal:

#### 1.- Adrenalina.

Funciona como dilatador del músculo liso bronquial.

Es un polvo cristalino, blanco, inodoro de sabor

ligeramente amargo que se oscurece gradualmente por exposición al aire, muy poco soluble en alcohol y en aceites, mientras que en agua un gramo Bitartrato de Adrenalina se disuelve en 3 mls.

Peso molecular: 333.3 grs/mol. (Compañía Química Sigma).

Se prepara un stock de  $1E-3$  M (si se disuelven 6.66 mgs. de Bitartrato de Adrenalina en 20 mls. de agua destilada) del cual se toman los volúmenes necesarios para alcanzar las concentraciones requeridas en los experimentos.

## 2.- Clorhidrato de Isoproterenol.

Es un poderoso activador de los receptores beta, relaja el músculo liso bronquial y fue utilizado en el tratamiento del asma bronquial.

Peso Molecular: 247.7 grs/mol (Compañía Química Sigma).

Se prepara un stock de una concentración de  $4.03E-4$  M (se disuelven 10 mgs. de Clorhidrato de Carbacol en 20 mls. de agua destilada) del que se toman los volúmenes necesarios para alcanzar las concentraciones requeridas en los experimentos.

## 3.- Clorhidrato de Verapamil.

Es la sustancia Calcio bloqueadora prototipo, utilizada en la clínica.

Peso Molecular: 454.9 grs/mol. Knoll

Se prepara un stock de  $1.09E-3$  M (se disuelven 10 mgs de Clorhidrato de Verapamil de 20 mls. de agua destilada).

De esta solución se toman los volúmenes para obtener las concentraciones requeridas durante el experimento.

#### 4.- Clorhidrato de Diltiazem.

Es una sustancia que se emplea como vasodilatador coronario.

Peso Molecular: 451 grs/mol.

Se prepara un stock de  $1E-3$  M (disolviéndose 4.5 mgs de Clorhidrato de Diltiazem en 10 mls. de agua destilada). De esta solución se toman los volúmenes necesarios para obtener las concentraciones requeridas durante el experimento.

#### 5.- Bepridil.

Peso Molecular: 403.22 grs/mol.

Se prepara un stock de  $1.24E-3$  M (debido a que el Bepridil es soluble en alcohol pero muy poco soluble en agua se pesan 10 mgs. de Bepridil y se disuelven en 1.5 mls. de alcohol y se afora con agua destilada a 20 mls.). De esta solución se toman los volúmenes requeridos para obtener las concentraciones necesarias durante el experimento.

Todas las sustancias mencionadas anteriormente a excepción del Bepridil se pueden disolver en agua destilada, pero tomando en cuenta la variabilidad de los volúmenes requeridos durante los experimentos es recomendable que se disuelvan en solución de KREBS, para evitar un cambio de

concentración del medio en el que se encuentra el músculo liso traqueal, al agregarle los volúmenes requeridos de las diferentes drogas.

" PROTOCOLO No. 1 "

Las drogas para inducir la broncoactivación fueron añadidas a los baños en concentraciones graduales (tabla I) para explorar el comportamiento del músculo liso mediante curvas dosis-respuesta. Al mismo tiempo se determinó la concentración a la que se induce en el músculo liso la máxima contracción con agonistas como el Carbacol, KCl e Histamina.

El registro de la contracción se hizo en un Poligrafo Grass, se lavó la preparación y se dejó estabilizar durante dos horas aproximadamente, en seguida se agregó una dosis de algún Calcio antagonista (Verapamil, Bepridil o Diltiazem) en una dosis única de  $1E-6$  M. El cual se dejó actuar por un espacio de 30 minutos. Y se volvió a exponer la preparación a las dosis acumulativas del agonista empleado inicialmente y se determinó el posible efecto que el antagonista fue capaz de inducir.

" PROTOCOLO No. 2 "

Este proceso experimental consistió en exponer a la preparación, a la concentración de agonista a la cual se obtiene una contracción máxima, se emplea sólo esta dosis única para inducir el máximo de contracción en el músculo liso y en seguida observar el efecto relajante que produce la aplicación de dosis acumulativas de drogas como la Adrenalina, Isoproterenol, Verapamil, Diltiazem y Bepridil a las concentraciones indicadas en la tabla II.

T A B L A I

Agonista	Concentración M/Lt.								
KCl	1E-3	2E-2	4E-2	8E-2	1E-1				
Histamina	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	5E-8	5E-5	
Carbacol	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	

T A B L A II

Antagonista	Concentración M/Lt.								
Adrenalina	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	
Isoproterenol	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	
Verapamil	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	
Diltiazem	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	
Bepriidil	1E-8	5E-8	1E-7	5E-7	1E-6	5E-6	1E-5	5E-5	

## ANALISIS DE RESULTADOS

---

Los resultados experimentales fueron ajustados mediante un programa elaborado en lenguaje PASCAL llamado DOSE-RESPONSE CURVE FITTING que utiliza una regresión lineal mediante mínimos cuadrados. Este programa se corrió en una computadora APPLE IIe.

La elaboración de las curvas se realizó en base a los experimentos realizados, de manera que el número de experimentos fue de 3 a 6 según se indique para cada curva.

D E F I N I T I O N

## R E S U L T A D O S

El comportamiento mecánico del músculo liso traqueal se determinó midiendo las contracciones inducidas sobre ese tejido con altas concentraciones de Potasio, Histamina y Carbacol, para ello se corrieron relaciones dosis-respuesta (D-R) para cada agonista a las concentraciones indicadas en la tabla I.

Las relaciones así obtenidas se utilizaron como control para un grupo de experimentos posteriores, sin embargo por otra parte, cabe aclarar que cada experimento en el que se empleó un Calcio antagonista tuvo su propio control.

En las curvas (D-R) del lado izquierdo (rombos) de las figuras 1, 2 y 3 se muestra la actividad contráctil en el músculo liso traqueal producida por los agonistas anteriormente mencionados, asimismo se puede observar que para obtener la máxima respuesta contráctil (figuras 1', 2' y 3' de los registros isométricos obtenidos en los experimentos) se necesitó una concentración de  $1E-1$  M para KCl, en cambio para la Histamina y el Carbacol se necesitó una concentración de  $5E-5$  M como se ilustra en las figuras mencionadas con anterioridad.

De igual forma se puede ver que la contracción se inició a concentraciones diferentes para cada agonista. Así el KCl la inició con  $2E-2$  M, la Histamina necesitó una concentración de  $1E-7$  M y el Carbacol con  $1E-8$  M.

Por otra parte para demostrar o valorar la

estabilidad, confiabilidad y repetibilidad de las diferentes respuestas, se efectuaron los siguientes experimentos:

#### PRIMER PROTOCOLO.

Se determinó el efecto que tiene el pretratamiento con dosis únicas de  $5E-6$  M de algunos Calcio antagonistas como lo son el Verapamil, Diltiazem y Bepridil sobre las curvas (D-R) de los agonistas utilizados, y señalados en cada figura, gráfica, cuadro, etc.

La droga que se considera como Calcio antagonista prototipo es el Verapamil, de manera que lo que se pretendió hacer fue determinar la potencia inhibidora del broncoespasmo que tiene el Diltiazem y Bepridil en comparación con el prototipo (tabla III y IV).

En las figuras 1, 2 y 3 se puede observar el efecto de los Calcio antagonistas a la contracción señalada anteriormente sobre la respuesta contráctil inducida con alto Potasio como se puede también observar en las figuras 1', 2' y 3' de los registros obtenidos en el Polígrafo Grass, donde la máxima concentración utilizada de este agonista fue de una concentración de  $1E-1$  M (tabla III).

Se puede ver que el efecto del Verapamil fue mayor que el de los otros dos ya que éste logró disminuir la respuesta contráctil máxima en un 58 % (figura 3 y 3'), mientras que el Diltiazem la disminuyó en un 50 % (figura 2 y 2') y el Bepridil en un 42 % (figura 1 y 1').

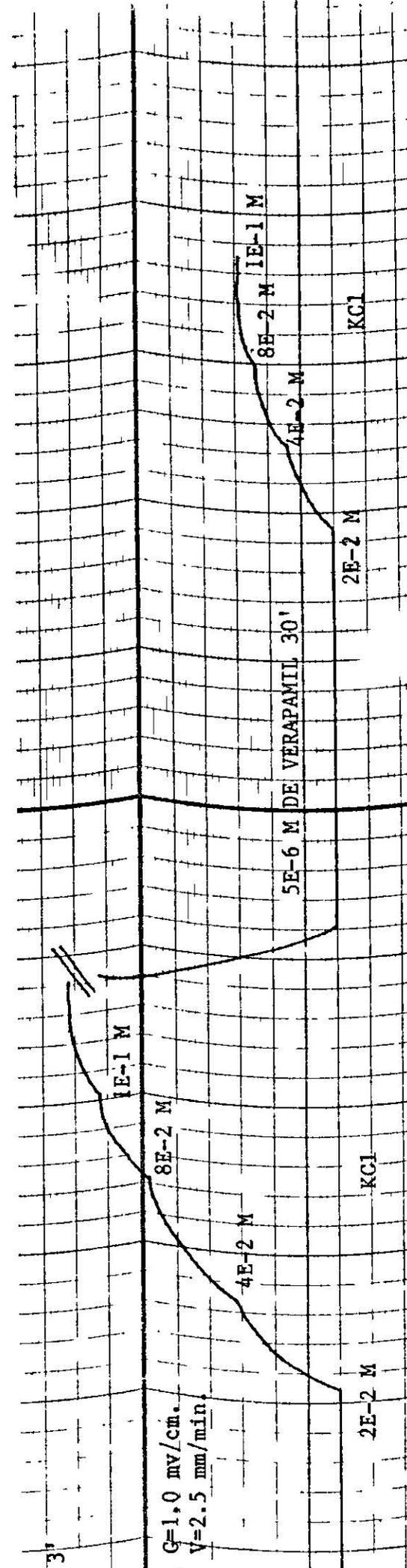
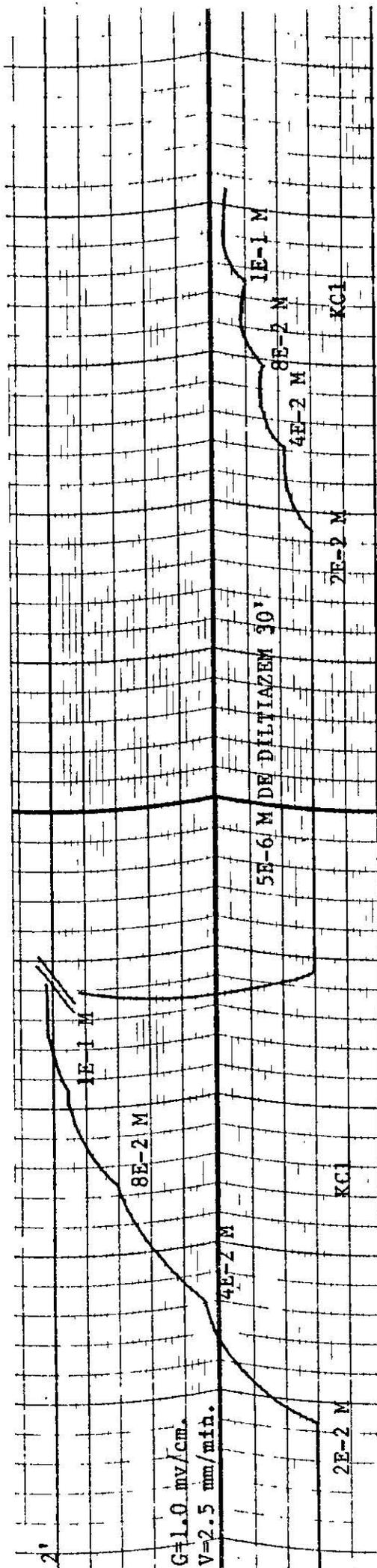
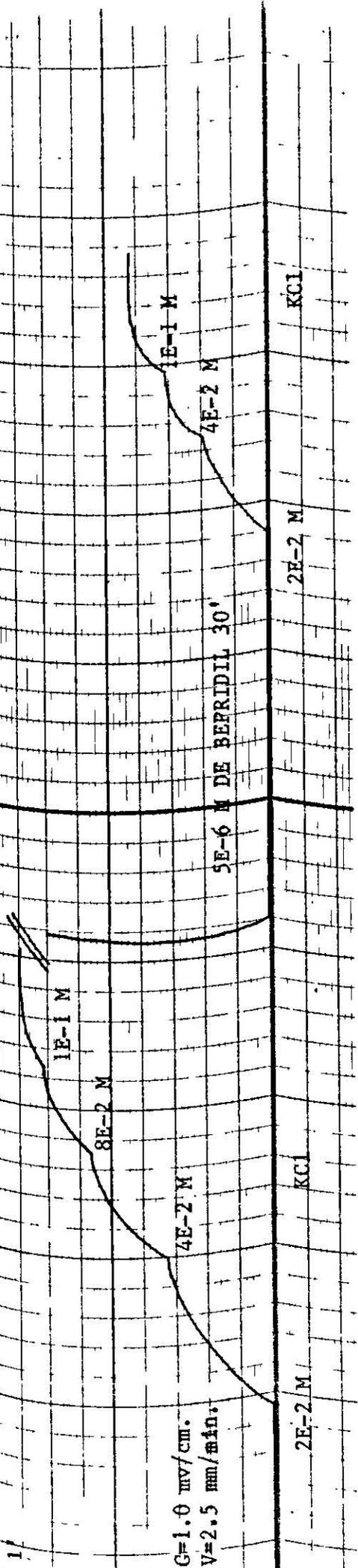
Estos resultados indican que la contracción inducida con KCl en el músculo liso es más sensible a Verapamil que a los otros Calcio antagonistas utilizados (tabla V).

Los resultados obtenidos en relación con las curvas dosis-respuesta cuando se usó la Histamina como agonista se pueden observar en las figuras 4, 5 y 6. También se pueden observar las figuras 4', 5' y 6' de los registros obtenidos para este agonista. En este caso el Bepridil logró reducir la respuesta contráctil en un 45 % (figura 4 y 4'), el Verapamil la redujo en un 40 % (figura 6 y 6'), mientras que el Diltiazem logró reducir la respuesta a un 25 % (figura 5 y 5').

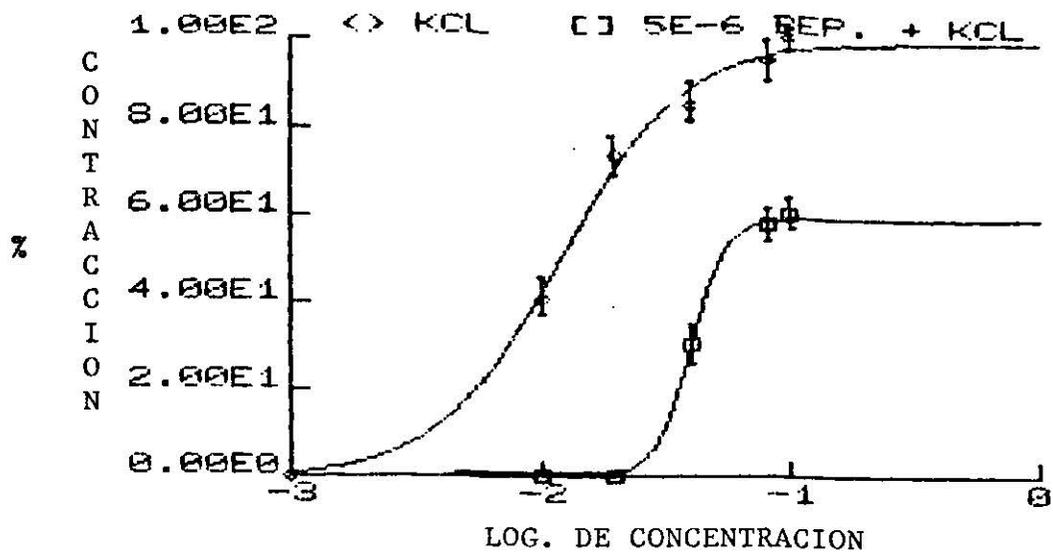
En las mismas figuras 4, 5 y 6 se puede observar que aún cuando el efecto fue más severo o marcado con Bepridil (figura 4), la sensibilidad del músculo liso a la contracción inducida por Histamina disminuyó en forma más notoria con el Verapamil a una concentración de  $5E-6$  M que es la concentración (dosis única) que se emplea en este primer análisis al igual que para Diltiazem y Bepridil (tabla IV).

En el caso de las contracciones inducidas con Carbacol el efecto del pretratamiento con los Calcio antagonistas se puede observar en las figuras 7, 8, 9 y en las figuras 7', 8' y 9' que son los registros obtenidos en un Poligrafo Grass durante los experimentos. La respuesta contráctil fue reprimida en un 40 % por el Verapamil (figura 9) mientras que el Diltiazem y Bepridil (figuras 8 y 7 respectivamente) lograron deprimirla en un 25 % con una concentración de  $5E-5$  M (tabla IV). También se puede observar que aún cuando se utilizaron las mismas

concentraciones de Carbacol que en las curvas dosis respuesta obtenidas inicialmente el efecto del Verapamil y del Diltiazem se observó con mayor eficacia a dosis pequeñas de Carbacol.

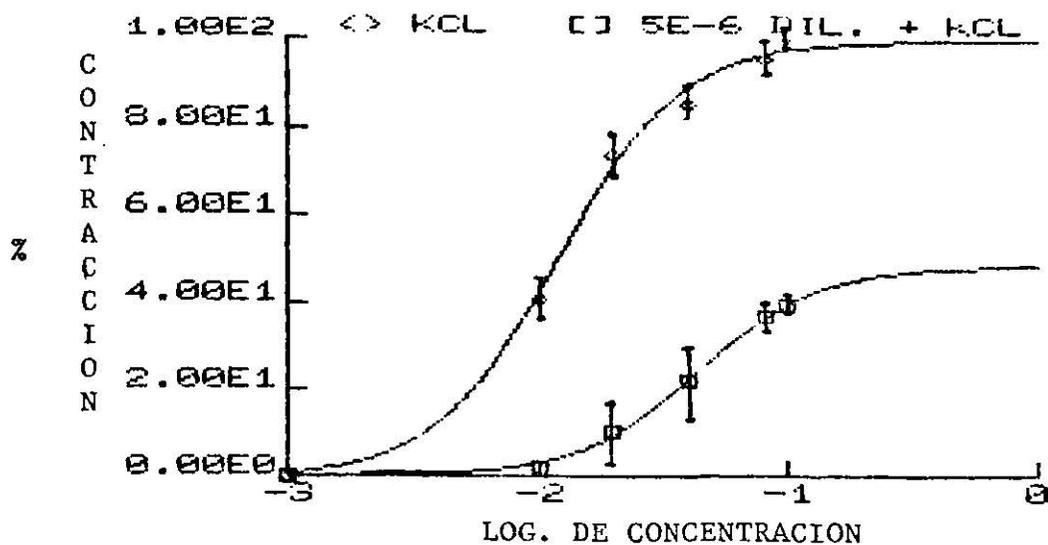


1



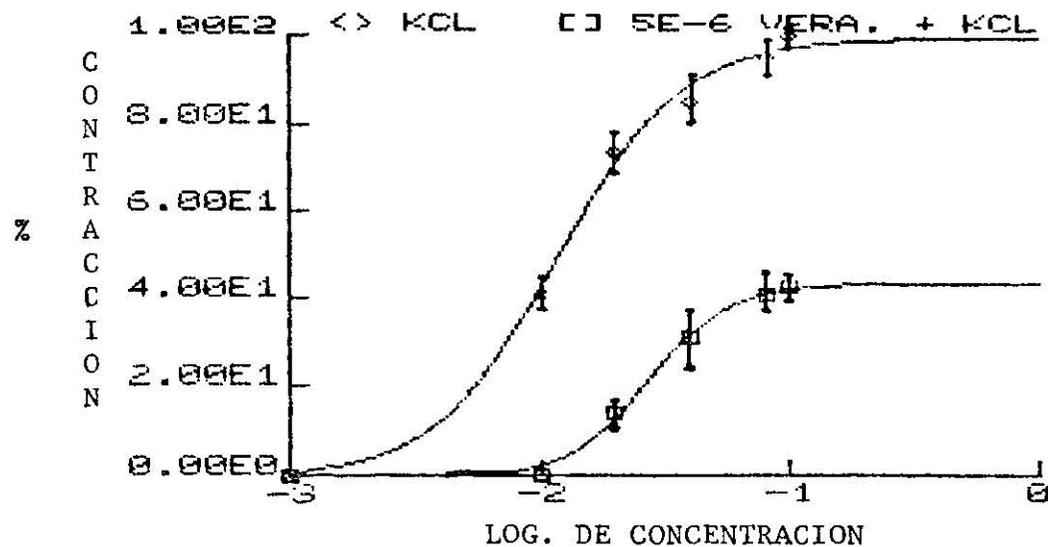
n=4

2



n=4

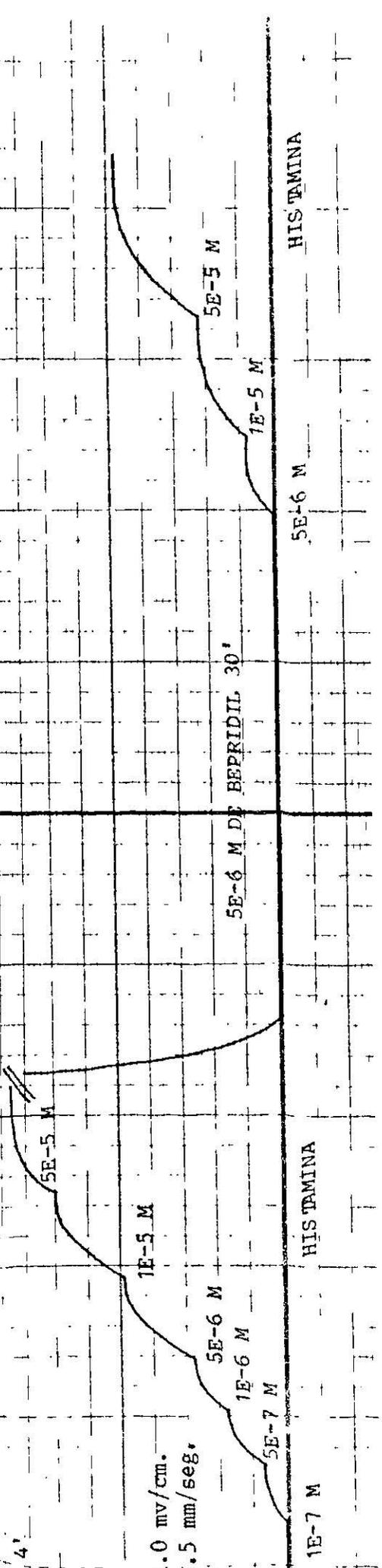
3



n=4

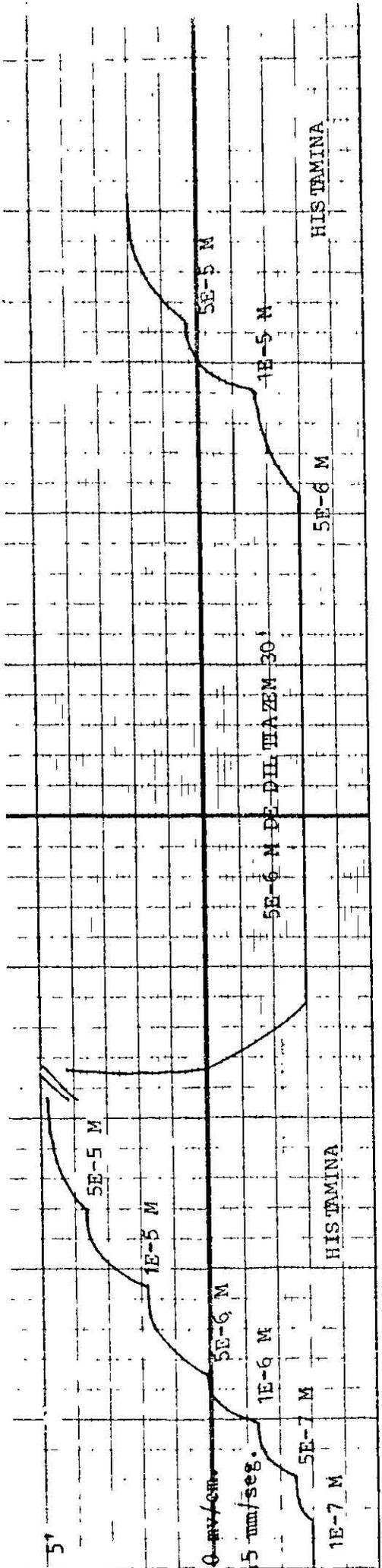
4'

= 1.0 mv/cm.  
= 2.5 mm/seg.



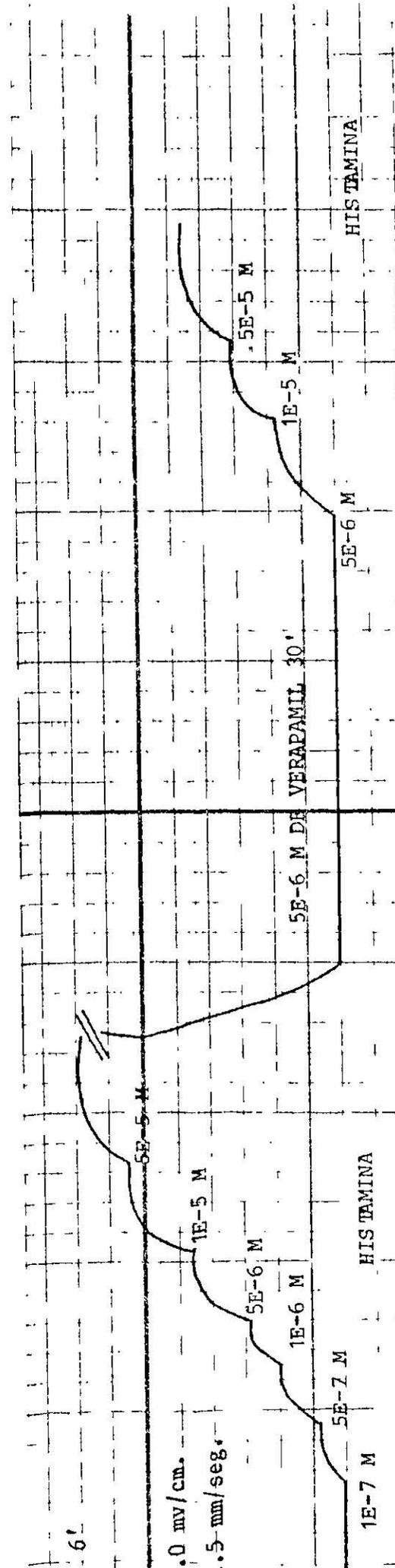
5'

= 1.0 mv/cm.  
= 2.5 mm/seg.

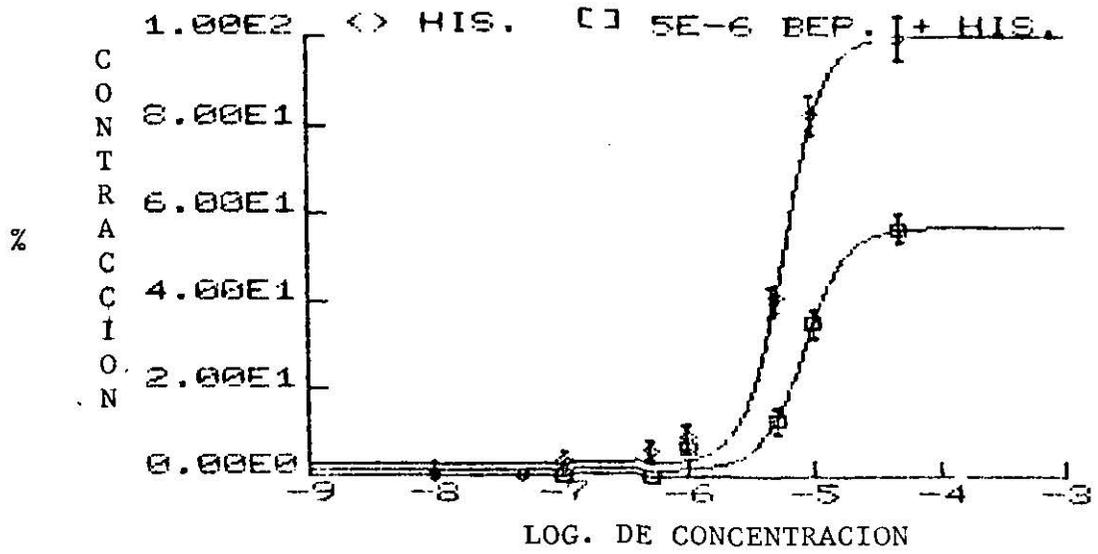


6'

G=1.0 mv/cm.  
V=2.5 mm/seg.

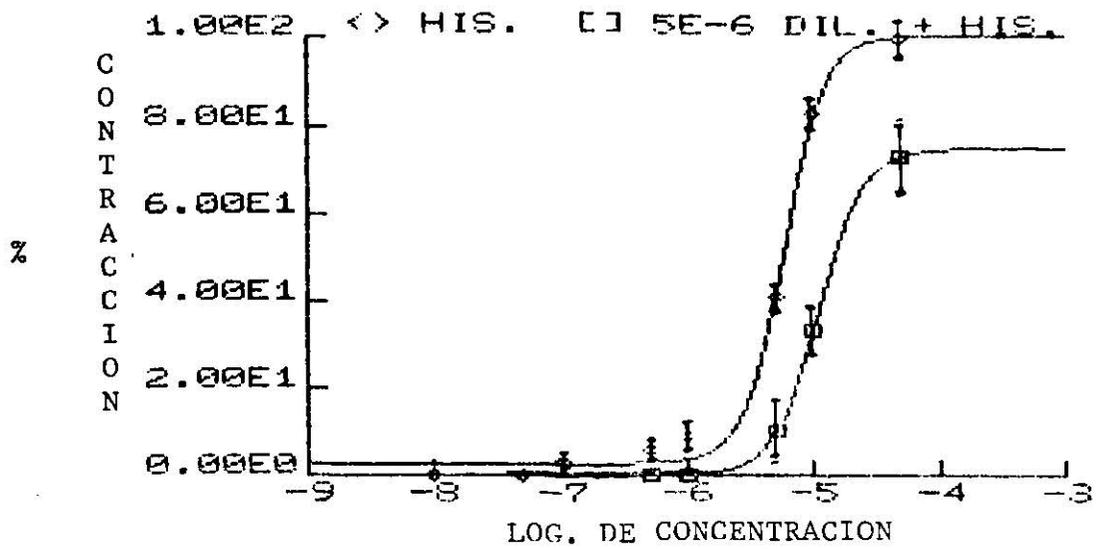


4



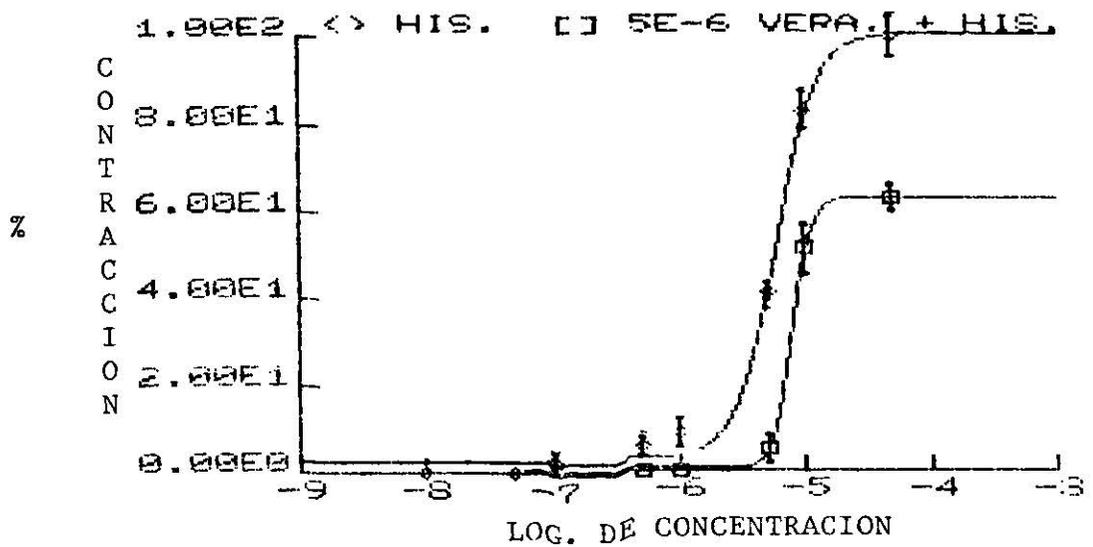
n=4

5

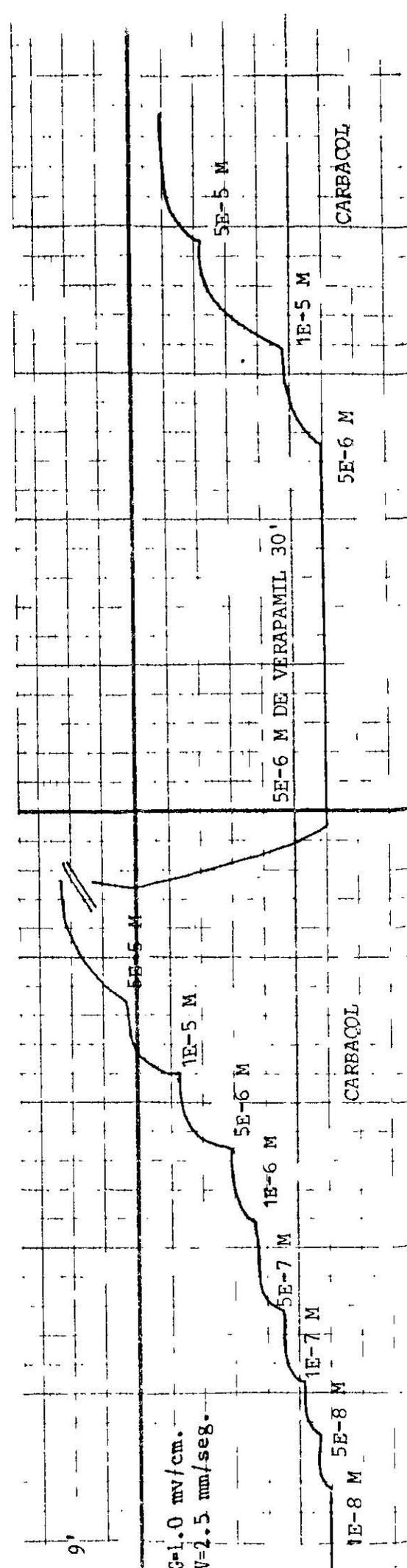
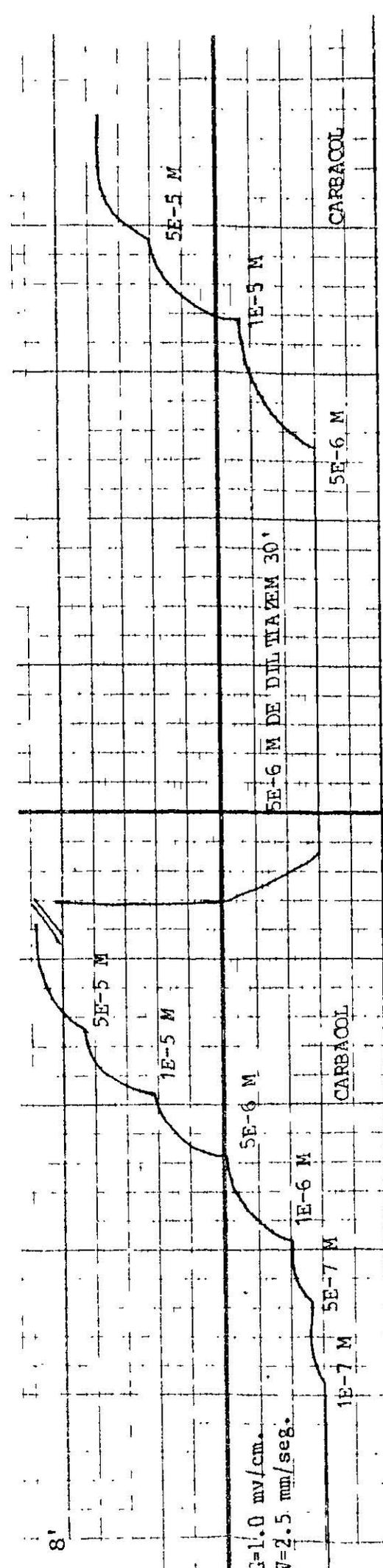
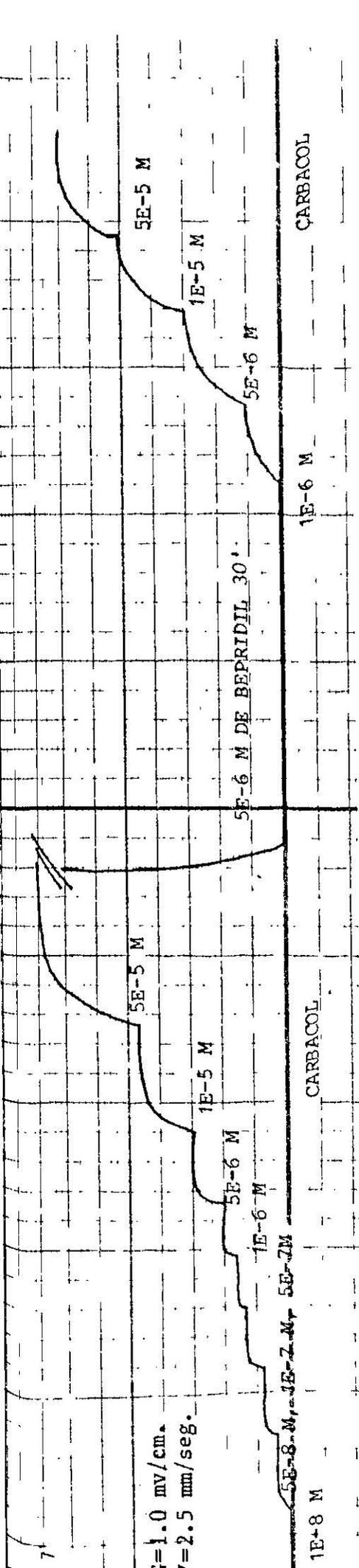


n=4

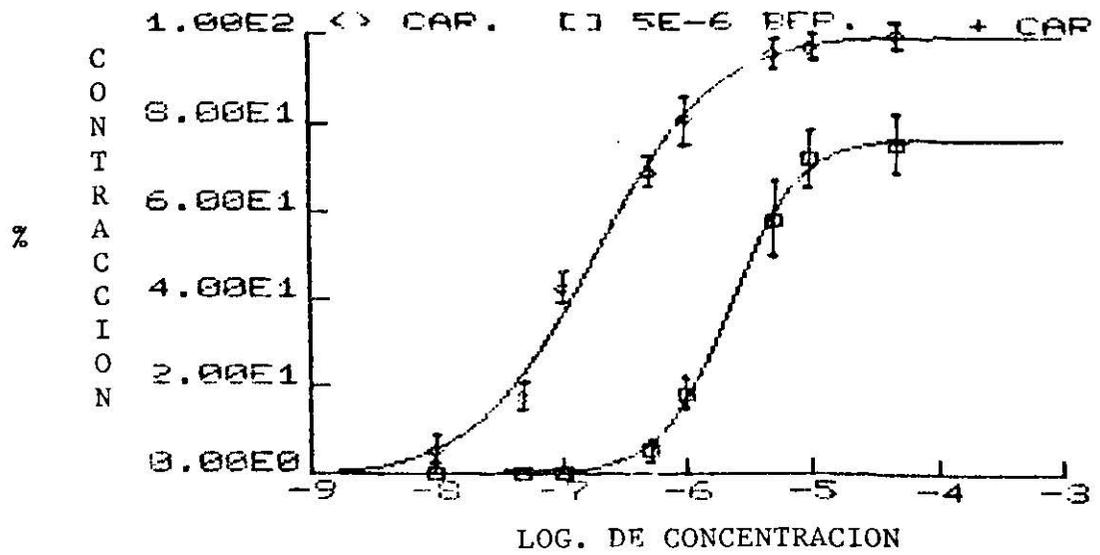
6



n=4

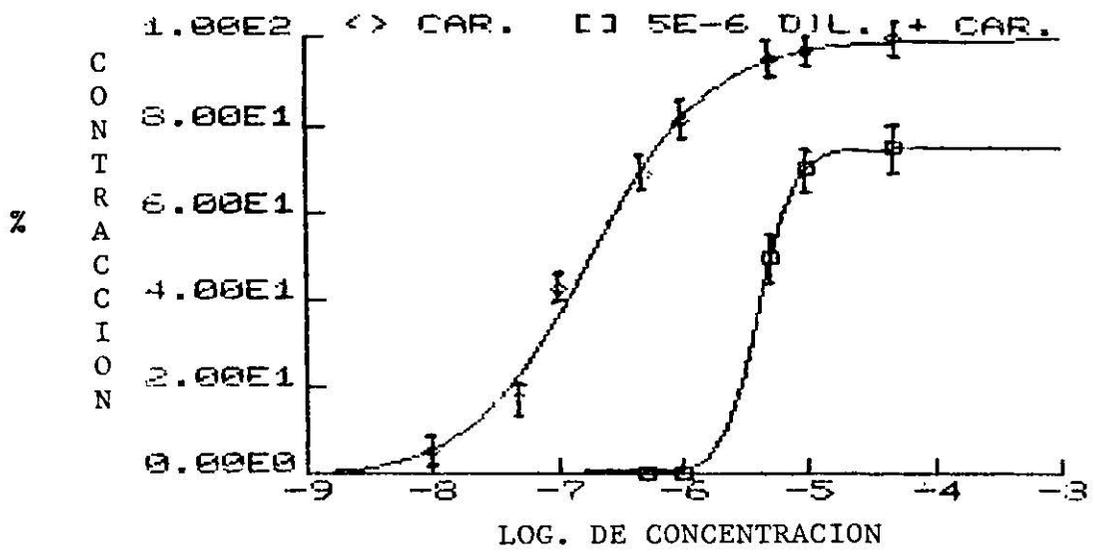


7



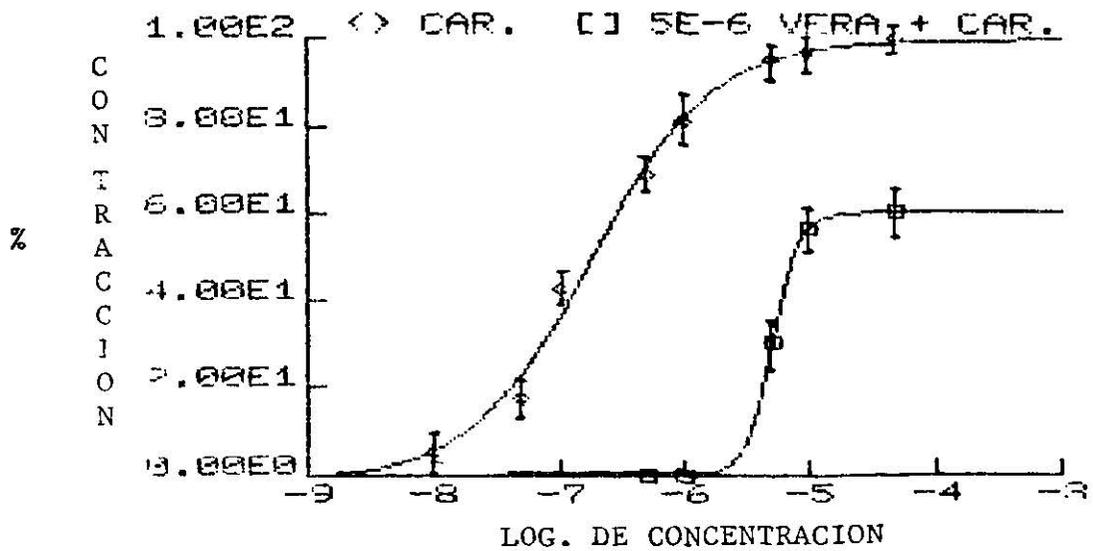
n=4

8



n=4

9



n=4

T A B L A      I I I

Relación entre las concentraciones de los agonistas  
Carbacol, Histamina y KCl con el % de contracción.

	25 %	50 %	75 %	100 %
KCl	7E-3 M	1.5E-2 M	2.5E-2 M	1E-1 M
Histamina	3E-6 M	7E-6 M	9E-6 M	5E-5 M
Carbacol	7E-8 M	2E-7 M	8E-7 M	5E-5 M

T A B L A      I V

Efecto de el pretratamiento con alguno de los siguientes Calcio  
antagonistas sobre las curvas dosis-respuesta de KCl.

	25 %	50 %	75 %	100 %
Bepriidil	4E-2 M	6E-2 M	-----	-----
Diltiazem	6E-2 M	2.5E-1 M	-----	-----
Verapamil	4E-2 M	-----	-----	-----

Efecto de el pretratamiento con alguno de los siguientes Calcio  
antagonistas sobre la curva dosis-respuesta de Histamina.

	25 %	50 %	75 %	100 %
Bepriidil	8E-6 M	2E-5 M	-----	-----
Diltiazem	8E-6 M	1.5E-5 M	6E-5 M	-----
Verapamil	7E-6 M	1E-5 M	-----	-----

Efecto de el pretratamiento con alguno de los siguientes Calcio  
antagonistas sobre la curva dosis-respuesta de Carbacol.

	25 %	50 %	75 %	100 %
Bepriidil	1.5E-6 M	4E-6 M	5E-5 M	-----
Diltiazem	3.5E-6 M	6E-6 M	1.5E-5 M	-----
Verapamil	8E-6 M	5E-6 M	-----	-----

## SEGUNDO PROTOCOLO:

Como segundo punto se estudió el efecto relajador de las siguientes drogas: la Adrenalina, el Isoproterenol, el Diltiazem, el Verapamil y el Bepridil, a las concentraciones indicadas en la tabla II. Y se observó el efecto que tienen sobre las contracciones máximas inducidas por los agonistas antes mencionados (KCl, Carbacol e Histamina).

El agente que se consideró como droga estándar o prototipo para la relajación del músculo liso respiratorio en función de su capacidad para revertir la mayoría de los cambios fisiológicos que se suscitan durante el choque anafiláctico fue la Adrenalina, a las concentraciones indicadas en la tabla II.

De acuerdo con los datos obtenidos resulta claro que esta amina simpaticomimética es muy eficaz revirtiendo la contracción inducida por Histamina con una ED-50 de  $5E-7$  M, pero que para el caso del Carbacol y el KCl es de  $8E-6$  M y  $2E-6$  M respectivamente, permaneciendo un tono remanente para Carbacol de 8 %, y de 20 % para KCl esto se puede observar en las figuras 10, 11 y 12 curvas D-R. Del mismo modo se pueden observar las figuras 10', 11' y 12' que son los registros isométricos obtenidos en los experimentos, mediante un Polígrafo Grass.

Otra droga que se utilizó fue el Isoproterenol que desde el punto de vista terapéutico es un broncodilatador muy eficiente pero cayó en desuso debido a sus efectos cardiovasculares deletereos.

Los resultados que se obtuvieron (figuras 13', 14'

y 15' que son los registros isométricos obtenidos durante los experimentos) con esta droga indican que el mayor efecto lo tuvo sobre la contracción inducida por Histamina (tabla V) ya que es capaz de revertirla en un 75 % a una concentración de  $7E-8$  M (figura 14), no así la inducida con KCl o Carbacol (figuras 13 y 15 respectivamente), donde el tono remanente fue del 20 % , cuando la ED-50 fue del orden de  $1E-6$  como se observa en las figuras 13, 14 , 15 curvas D-R y en la tabla V.

El efecto broncodilatador del Verapamil (a las concentraciones indicadas en la tabla II) fue el que más se semejó al de la Adrenalina. Los resultados se pueden observar en las figuras 16', 17' y 18' que son los registros isométricos que se obtuvieron durante los experimentos los cuales indican que este Calcio antagonista es capaz de revertir en un 100 % la contracción inducida por los tres agonistas utilizados (figuras 16, 17 y 18 curvas D-R) con una ED-50 de  $5E-6$  M para KCl (figura 16),  $5E-6$  M para Histamina (figura 17) y de  $2E-5$  M para Carbacol en la figura 18 y en la tabla V.

Los datos obtenidos en los experimentos (19', 20' y 21' figuras de los registros isométricos) con Bepridil indican que éste es menos eficiente para revertir las contracciones inducidas por los agonistas utilizados (KCl, Histamina y Carbacol) ya que para revertir el 50 % de la contracción inducida por  $1E-1$  M de KCl se requirió de una concentración del orden de  $1E-5$  M de este Calcio antagonista, la cual es ligeramente superior a la de las otras drogas relajantes tabla V.

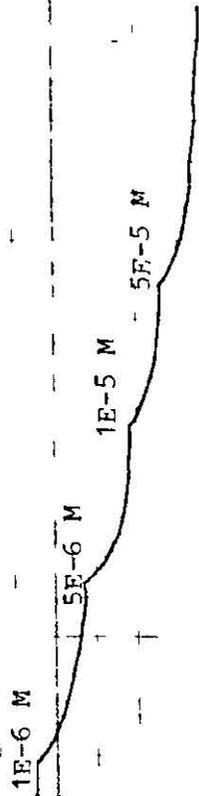
El efecto de la contracción se logró revertir en un

75 % sólo en las contracciones inducidas con histamina y Carbacol ya que en el caso de la inducida con KCl permaneció un tono remanente de un 40 % (figuras 19, 20 y 21 curvas D-R).

Por último se empleó, el Diltiazem el cual resultó ser el que más se asemeja a la Adrenalina revirtiendo el broncoespasmo inducido por KCl (figuras 22', 23' y 24' registros isométricos). Aunque por otra parte el Diltiazem no logró revertir completamente la repuesta contractil evocada por los otros dos agonistas. Quedando un tono remanente de 20 % para Histamina y de 30 % para Carbacol (figuras 22, 23 y 24 curvas D-R).

10' CONTRACCION INDUCIDA CON 1E-1 M DE KCl - RELAJACION CON ADRENALINA.

1E-8 5E-8 1E-7 5E-7 M

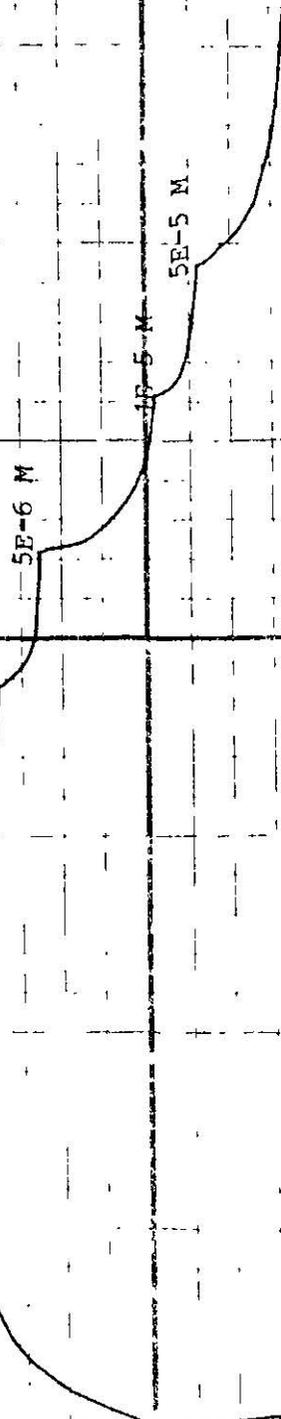


G=1.0 mv/cm.  
V=2.5 mm/seg.

1E-4 M DE KCl

11' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE HISTAMINA - RELAJACION CON ADRENALINA.

1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7 M 1E-6 M



G=1.0 mv/cm.  
V=2.5 mm/seg.

5E-5 M DE HISTAMINA

12' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE CARBACOL - RELAJACION CON ADRENALINA.

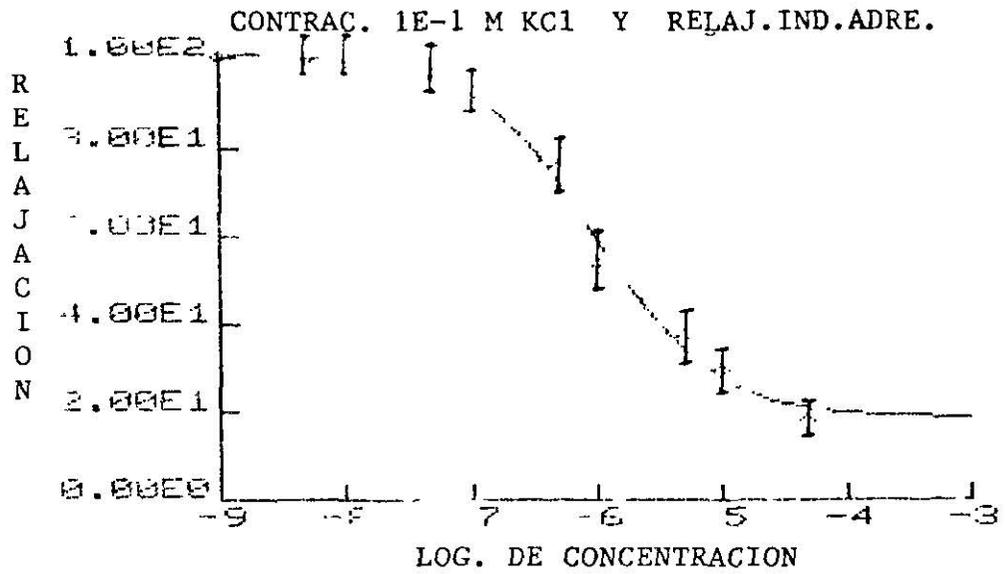
1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7M 1E-6M 5E-6 M



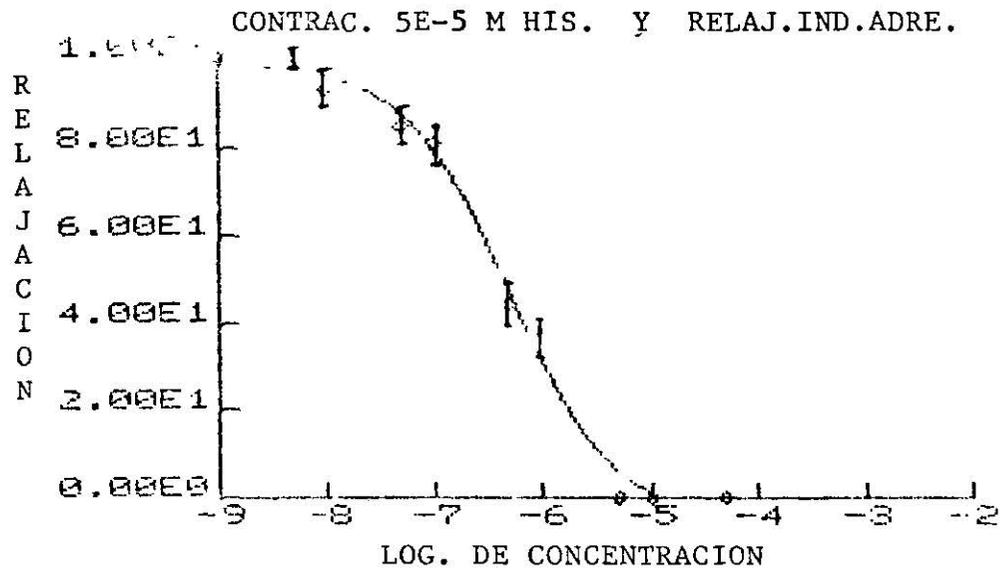
G=1.0 mv/cm.  
V=2.5 mm/seg.

5E-5 M DE CARBACOL

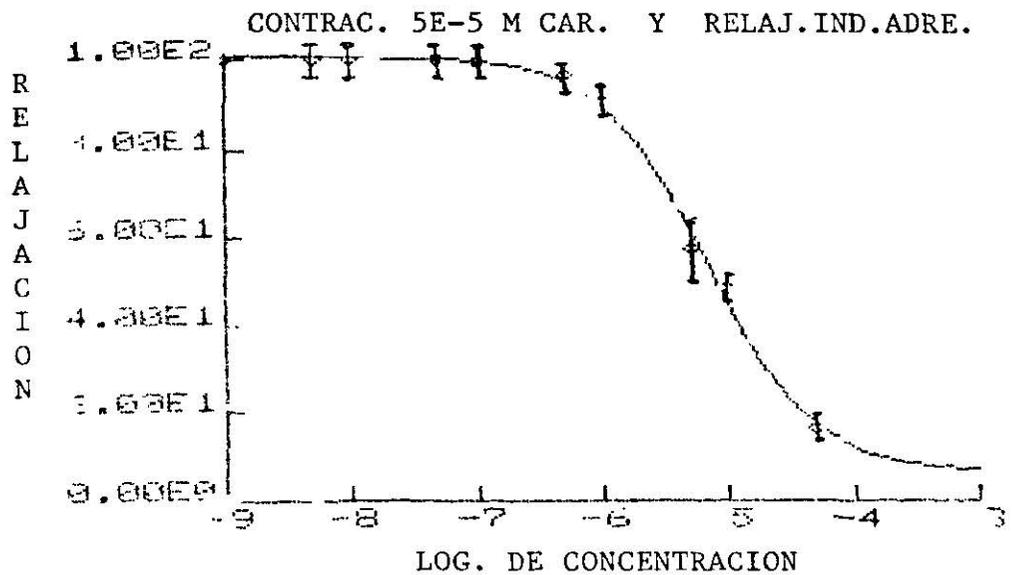
10



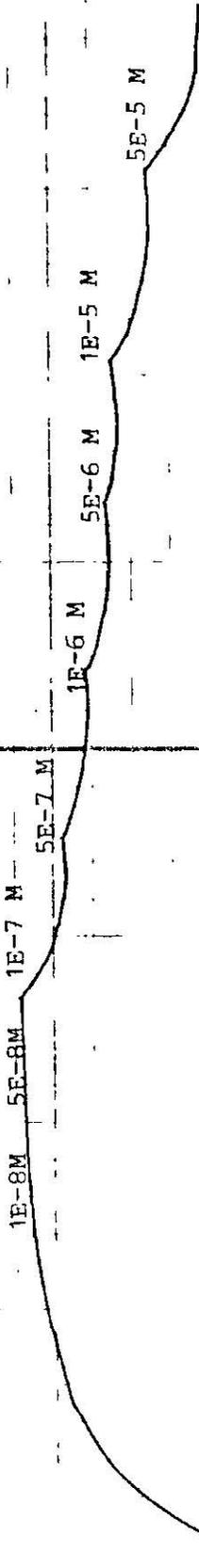
11



12

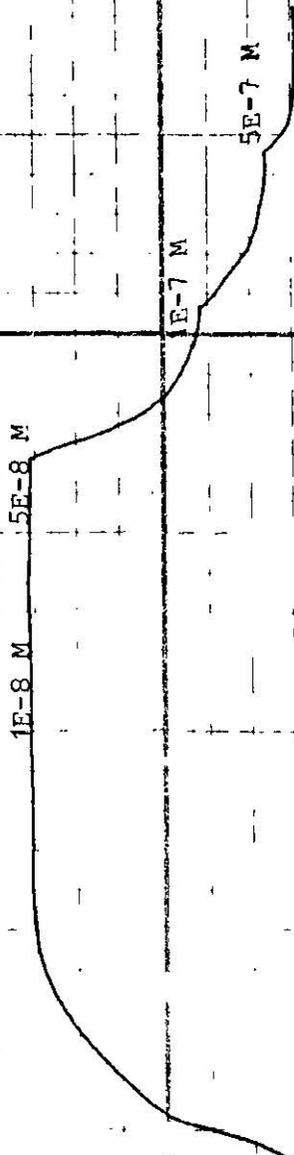


13' CONTRACCION INDUCIDA CON 1E-1 M DE KCl - RELAJACION CON ISOPROTERENOL.



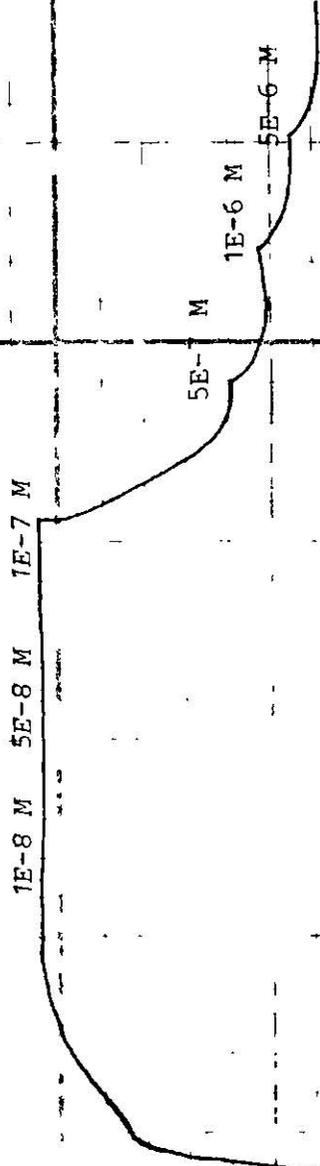
1E-1 M DE KCl

14' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE HISTAMINA - RELAJACION CON ISOPROTERENOL.



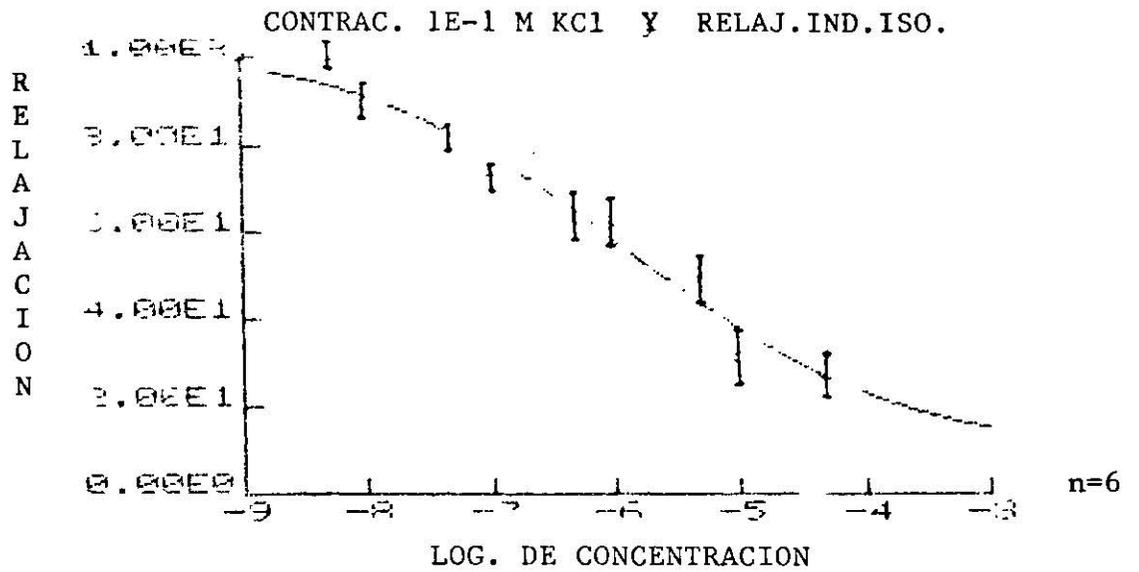
5E-5 M DE HISTAMINA

15' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE CARBACOL - RELAJACION CON ISOPROTERENOL.

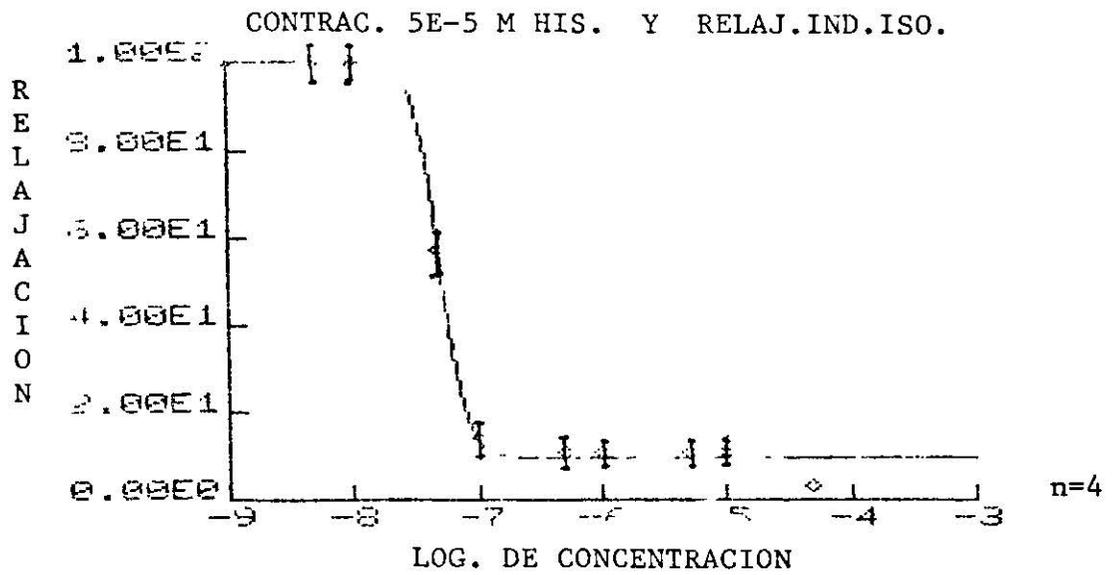


5E-5 M DE CARBACOL

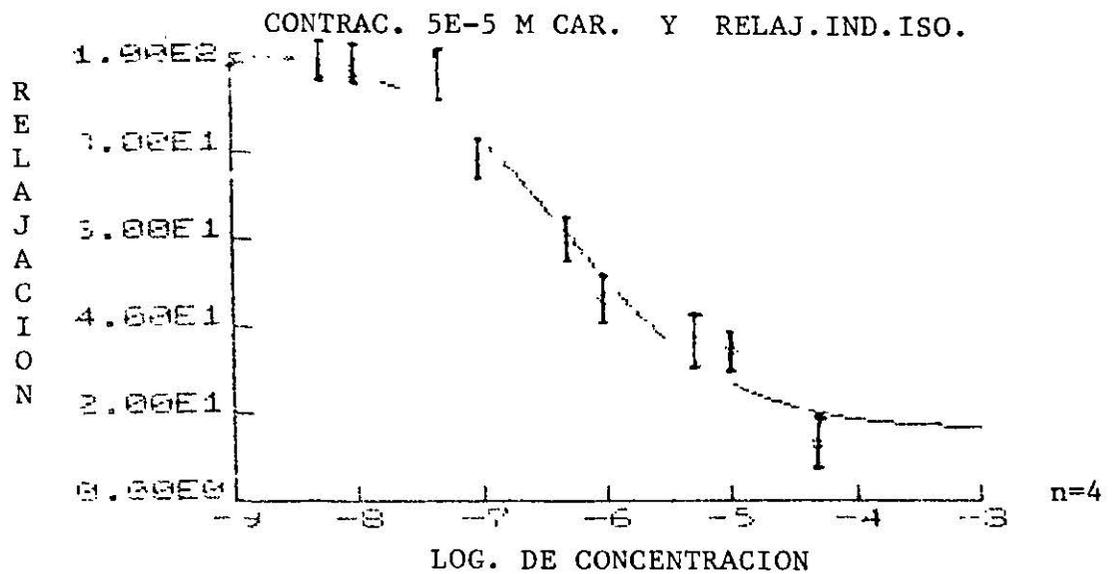
13



14



15



16' CONTRACCION INDUCIDA CON 1E-1 M DE KCL - RELAJACION CON VERAPAMIL.

1E-8 M  
5E-6 M

1E-6 M

5E-6 M

1E-5 M

5E-5 M

1E-1 M DE KCL

17' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE HISTAMINA - RELAJACION CON VERAPAMIL.

1E-8 M 5E-8 M 1E-7 M

5E-7 M

1E-6 M

5E-6 M

1E-5 M

5E-5 M

5E-5 M DE HISTAMINA

18' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE CARBACOL - RELAJACION CON VERAPAMIL.

1E-8 M 5E-8 M 1E-7 M

5E-7 M

1E-6 M

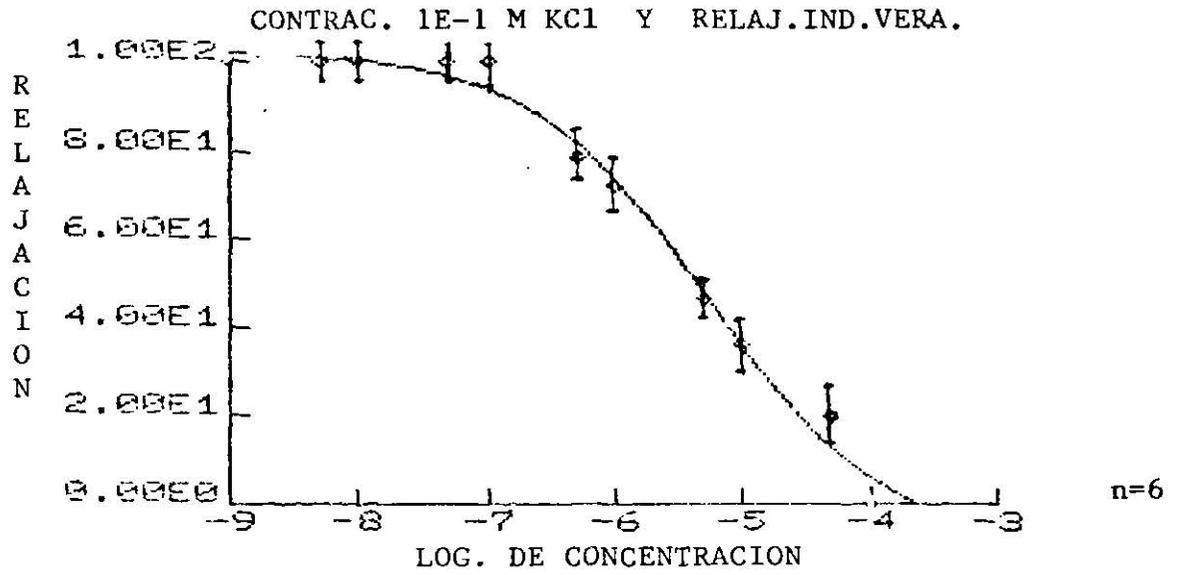
5E-6 M

1E-5 M

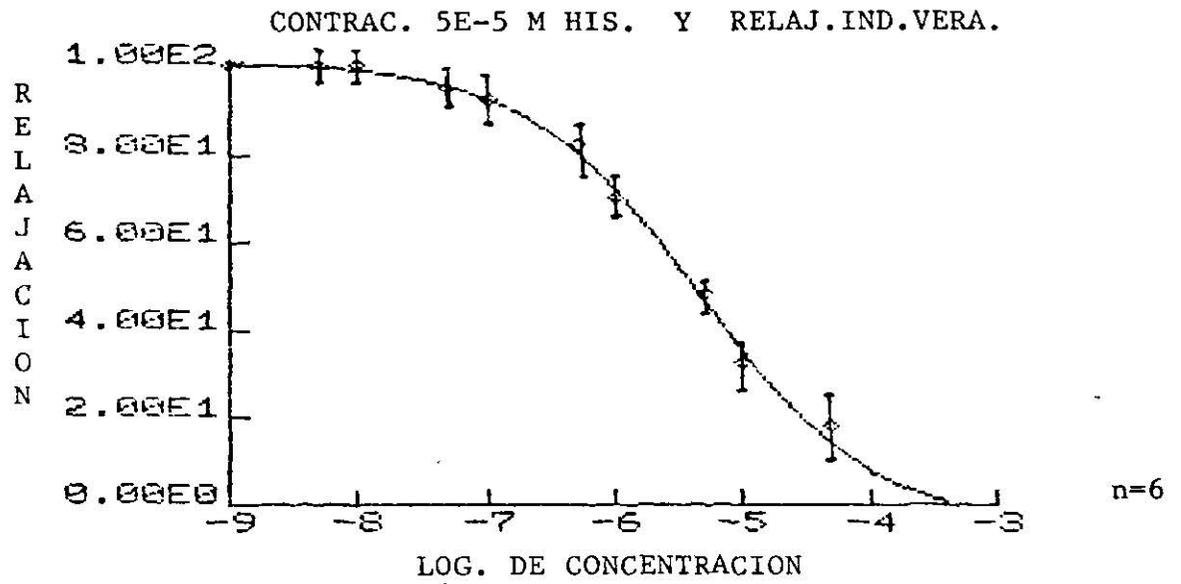
5E-5 M

5E-5 M DE CARBACOL

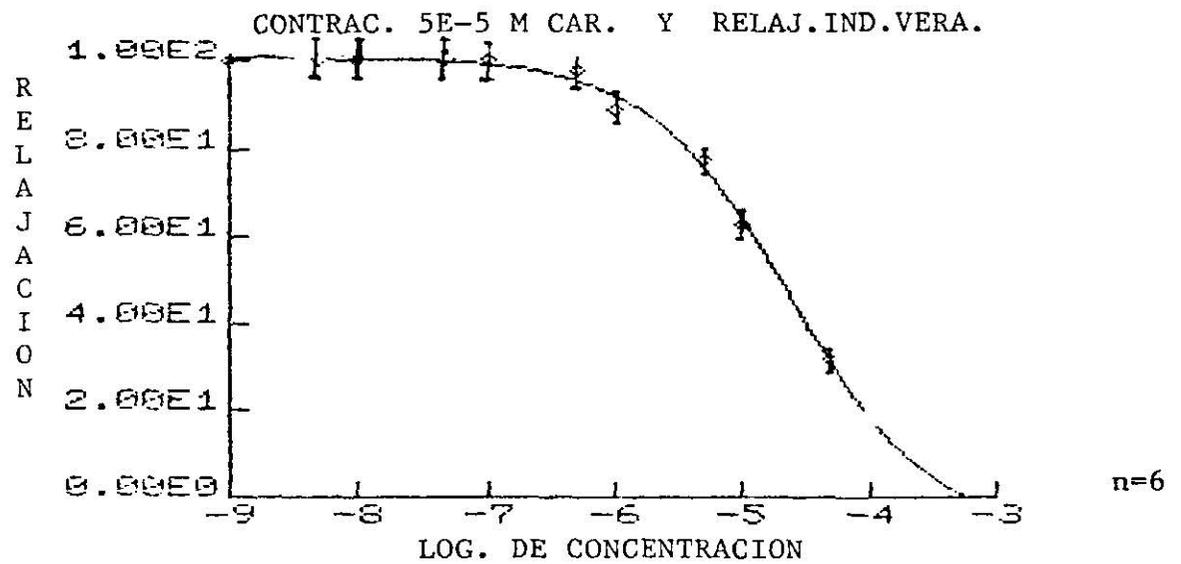
16



17



18



19'

CONTRACCION INDUCIDA CON 1E-1 M DE KCl - RELAJACION CON BEPRIDIL.

1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7M

1E-6M 5E-6M 1E-5M

5E-5M

1E-1 M DE KCl

20'

CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE HIS TAMINA - RELAJACION CON BEPRIDIL.

1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7M 1E-6M 5E-6M

1E-5M

5E-5M

5E-5 M DE HIS TAMINA

21'

CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE CARBACOL - RELAJACION CON BEPRIDIL.

1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7M

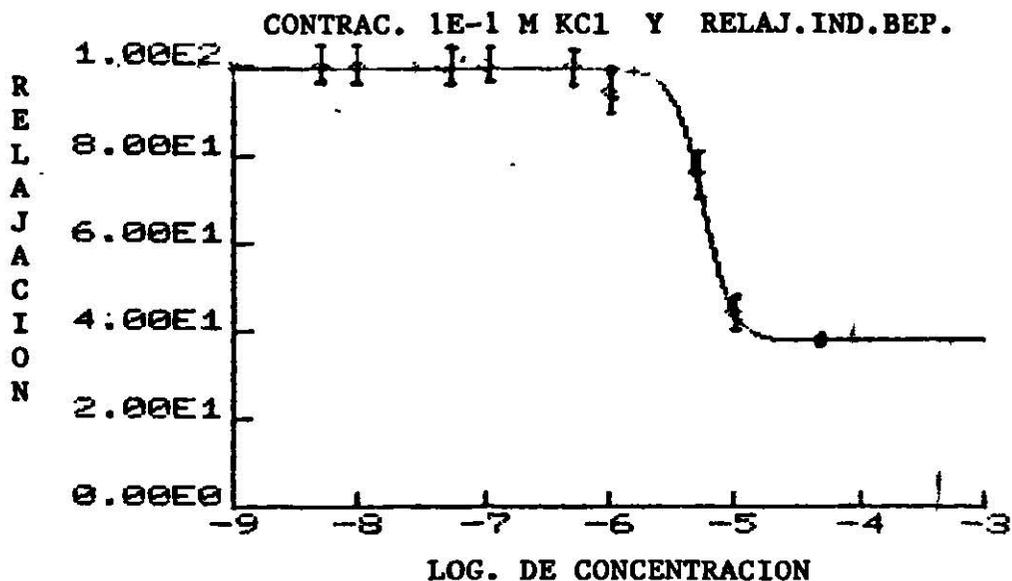
1E-6M 5E-6M

1E-5M

5E-5M

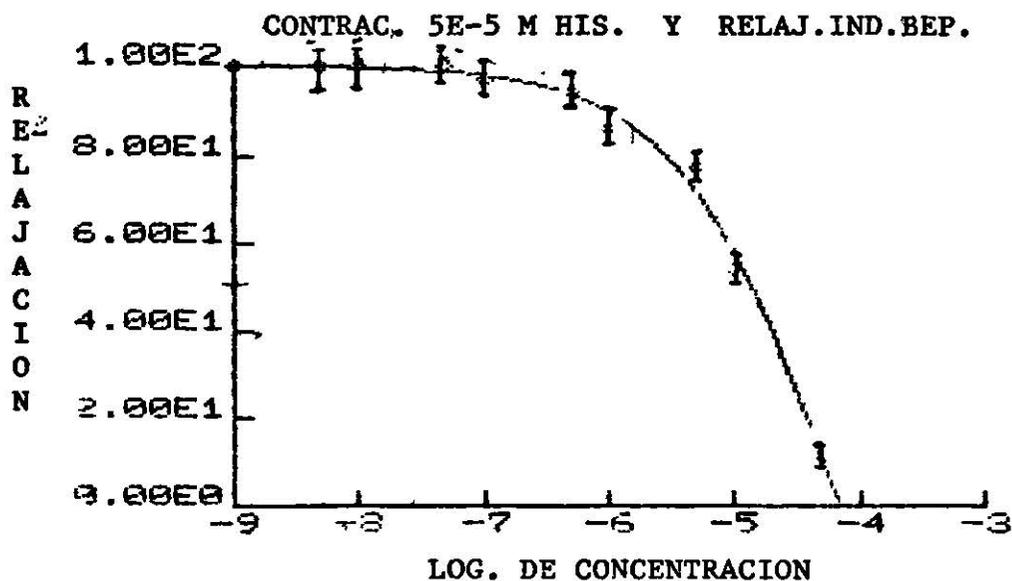
5E-5 M DE CARBACOL

19



n=5

20



n=5

21



n=5

22' CONTRACCION INDUCIDA CON 1E-1 M DE KCl - RELAJACION CON DILTIAZEM.

1E-8M 5E-8M 1E-7M 5E-7M 1E-6 M 5E-6 M 1E-5 M 5E-5 M

1E-1 M DE KCl

23' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE HISTAMINA - RELAJACION CON DILTIAZEM.

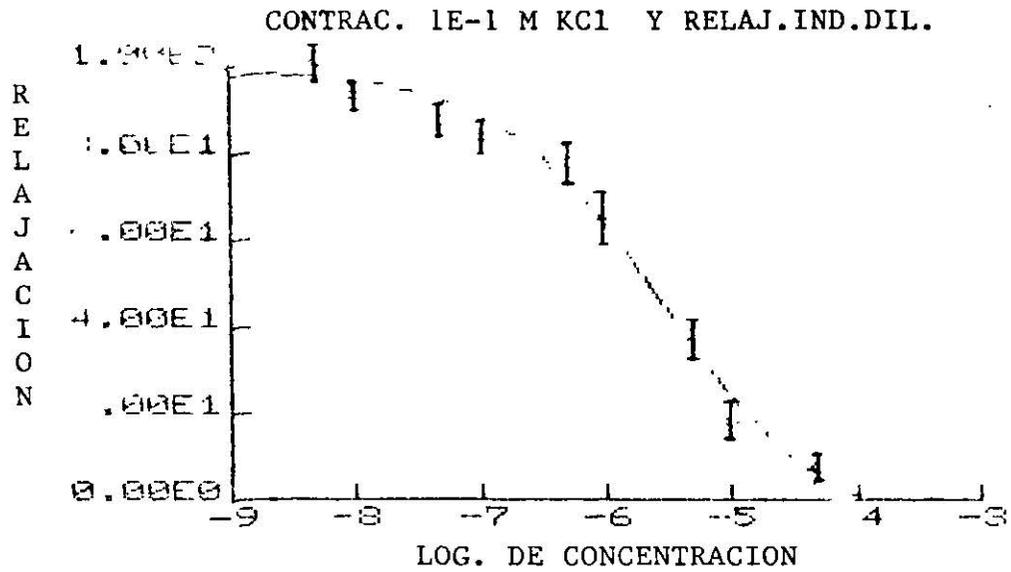
1E-8 M 5E-8 M 1E-7 M 5E-7 M 1E-6 M 5E-6 M 1E-5 M

5E-5 M DE HISTAMINA

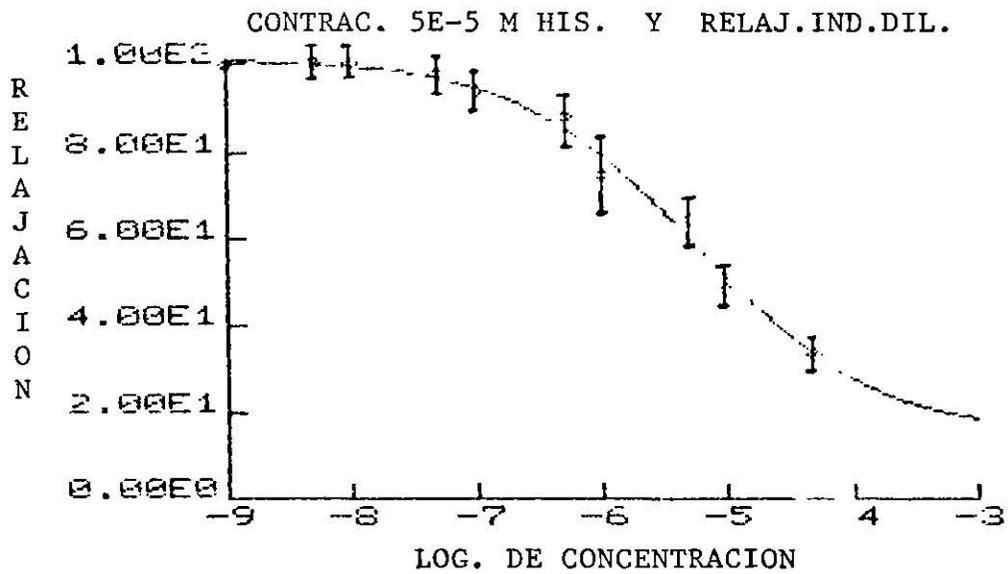
24' CONTRACCION INDUCIDA CON 5E-5 M DE CARBACOL - RELAJACION CON DILTIAZEM.

1E-8 M 5E-8 M 1E-7 M 5E-7 M 1E-6 M 5E-6 M 1E-5 M 5E-5 M

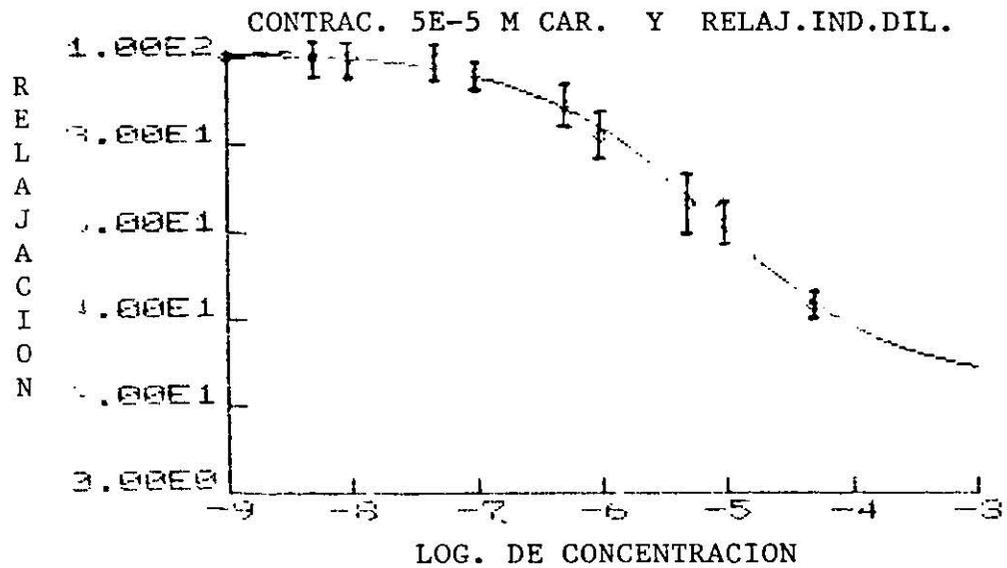
5E-5 M DE CARBACOL



23



24



T A B L A V

Concentración de Calcio antagonista necesaria para revertir la contracción inducida por 1E-1 M de KCl.

	ED-25	ED-50	ED-75
Adrenalina	4E-7 M	2E-6 M	1E-6 M
Isoproterenol	1E-7 M	2.5E-6 M	3E-5 M
Verapamil	1E-6 M	5E-6 M	1.5E-5 M
Diltiazem	5E-7 M	2E-6 M	1E-6 M
Bepridil	5E-6 M	8E-6 M	-----

Concentración de Calcio antagonista necesaria para revertir la contracción inducida por 5E-5 M de Histamina.

	ED-25	ED-50	ED-75
Adrenalina	2E-7 M	5E-7 M	1E-6 M
Isoproterenol	5E-8 M	6E-8 M	7E-8 M
Verapamil	9E-7 M	5E-6 M	2E-5 M
Diltiazem	1E-6 M	1E-5 M	1E-4 M
Bepridil	4E-6 M	1.5E-5 M	3E-5 M

Concentración de Calcio antagonista necesaria para revertir la contracción inducida por 5E-5 M de Carbacol.

	ED-25	ED-50	ED-75
Adrenalina	2E-6 M	8E-6 M	3E-5 M
Isoproterenol	1E-7 M	2E-6 M	-----
Verapamil	5E-6 M	2E-5 M	7E-5 M
Diltiazem	2E-6 M	3E-5 M	5E-4 M
Bepridil	1.5E-5 M	2.5E-5 M	4E-5 M

**D I S C U S S I O N**

## DISCUSION

---

En este trabajo se investigó la posibilidad de que algunos Calcio antagonistas pudieran emplearse en el tratamiento del broncoespasmo producido durante estados asmáticos.

El Asma es un estado reversible de la obstrucción de vías aéreas causado por la activación y respuesta de diferentes tipos de células. Evidencia reciente ha demostrado que las células musculares lisas y las células cebadas que son las que intervienen principalmente en los procesos de broncoconstricción, requieren de reacciones dependientes del ión Calcio para su activación. Por lo que varios agentes han sido desarrollados para prevenir la corriente de Calcio al interior de la célula, entre ellos el Verapamil, Diltiazem y Bepridil.

El movimiento del Calcio en la membrana celular está asociada con el acople excitación-contracción de las células musculares lisas, y con la liberación de mediadores químicos de las células cebadas.

Inicialmente el método empleado para determinar el mecanismo de acople excitación-contracción fue descrito por Castillo y Debeer en 1947 en el cual se emplea anillos traqueales integros los cuales son unidos para formar cadenas de 4 unidades. Sin embargo las respuestas de las contracciones inducidas por agonistas como el KCl eran poco consistentes y el tiempo en producirse la respuesta, era muy variable.

Este método sufrió una modificación (Akcasu, 1952),

debido a su poca consistencia.

Tal modificación consiste en unir los anillos por sus lados cartilaginoso mas cercanos al músculo liso y cortar cada anillo por el centro del cartilago, lo cual permitió una mayor amplitud de la respuesta, así como también fue posible obtener resultados mas reproducibles en comparación con el otro método de unidades traqueales integras (Castillo y Debeer, 1947).

Los Calcio bloqueadores parecieron ser en principio una herramienta lógica de prevenir o inhibir las reacciones de las células dependientes de Calcio, a semejanza de su actuación en vasos sanguíneos.

El movimiento del Calcio a través de la membrana celular, ha sido intensamente investigado en las dos principales células, envueltas en el proceso de obstrucción de las vías aéreas, éstas son las células musculares lisas y las células cebadas.

Sin embargo la acción específica de dichas células difieren en su actividad funcional pero ambas son dependientes del ión Calcio para su activación. Para que se produzca tal activación es necesario que estas células reciban un estímulo ya sea bioquímico o antigénico, el cual activa un receptor muy específico de la membrana para iniciar el proceso de la entrada del Calcio.

Dependiendo del estímulo recibido por la célula, el Calcio puede seguir principalmente dos caminos o canales para entrar a ella. Uno de ellos se le ha llamado canal sensible a Potencial (CCSP) y un segundo canal de Calcio sensible a Receptor

(CCSR), el cual se abre mediante el estímulo de un espasmógeno, como se muestra en la figura A.

Existen varias evidencias que permiten distinguir entre los canales, a partir de la hipótesis de que la depolarización de la membrana y la ocupación del receptor pueden abrir dichos canales por separado, algunas de esas evidencias son las siguientes:

1.- El flujo de Calcio es aditivo.

Demostrado mediante la estimulación con alto Potasio y Norepinefrina esto produce un máximo flujo de Calcio el cual es aproximadamente aditivo en la aorta de conejo. Dicha aditividad también se encuentra en los vasos mesentericos de resistencia (Meisheri KD, Hwang O van Breemen C., 1981).

2.- Inhibición selectiva de los canales.

Los Calcio antagonistas como el Diltiazem y D 600 son capaces de inhibir el flujo de Calcio inducido por alto Potasio más que el inducido con Norepinefrina en la aorta de conejo (Loutzenhiser R, Van Breemen C., 1983). De este estudio y de otros similares se determinó que los canales sensibles a Potencial son más sensibles a los Calcio antagonistas orgánicos que los canales sensibles a receptor). Sin embargo en los vasos mesentéricos de resistencia del conejo las contracciones inducidas por Norepinefrina son más sensibles a Diltiazem y D 600 (Cauvin C, Loutzenhiser R, van Breemen C., 1983), esto demuestra que la selectividad también depende de que tipo de vaso sea estimulado.

3.- Activación diferencial de los canales.

La evidencia mas fuerte que apoya el hecho de que

los agonistas pueden abrir los CCSR (canales de Calcio sensibles a receptor) en el músculo liso, es el hecho de que pueden producir la entrada del ión Calcio y por tanto inducir la contracción en el músculo liso en ausencia de la depolarización de la membrana. Dichas observaciones han sido descritas observando la activación de la Aorta de conejo con Norepinefrina, los resultados indican que esta droga induce la entrada de Calcio a través de los CCSR mejor que a través de CCSP en este vaso. También se encontró que la Norepinefrina es capaz de inducir virtualmente la misma contracción y por lo tanto el mismo flujo de Calcio en tejidos depolarizados y tejidos con una polarización normal (Cauvin y Van Breemen, 1985). Con lo que se concluye que la Norepinefrina activa CCSR (canales de Calcio sensibles a receptor) en el músculo liso arterial de conejo, en modo distinto que PSCs activados por la depolarización producida por alto Potasio (80 mM).

Las células cebadas pueden ser activadas por un estímulo antigénico, el cual se lleva a cabo mediante el siguiente proceso: El antígeno se une a la porción Fab del anticuerpo IgE que se encuentra en la membrana de la célula, provocando un cambio bioquímico en ella, que se traduce en la activación de los sitios receptores de transporte, de manera que el Calcio es liberado de los gránulos y del retículo sarcoplásmico de la célula, originando a su vez la formación y liberación de mediadores químicos como la Histamina que es capaz de causar la contracción del músculo liso (David. G Tinkelman, 1985).

En el caso de las células musculares lisas, el

sistema de transporte de la membrana celular es activado por un estímulo ya sea bioquímico o antigénico, lo que provoca la movilización de Calcio desde los depósitos extracelulares, los de la mitocondria y del retículo sarcoplásmico a la matriz citoplásmica, en seguida se une el ión Calcio con la Calmodulina formándose el complejo Ca-calmodulina, después este complejo se une a las cadenas ligeras de Miosina kinasa inactiva, pero que al unirse al complejo se activa. Más tarde se produce la fosforilación de la Miosina por medio de una fosfatasa y así la Miosina ya fosforilada se une con la Actina produciéndose de esta forma la contracción en las células musculares lisas.

Por lo anteriormente mencionado este trabajo de investigación se enfocó hacia la determinación del comportamiento del músculo liso al ser estimulado mediante agonistas de los canales de Calcio como la Histamina, el Carbacol y el KCl, así como también determinar el comportamiento del músculo liso ante un pretratamiento con algunos Calcio bloqueadores como el Verapamil, Bepridil y Diltiazem, de igual forma el efecto que tienen dichas drogas sobre la contracción inducida previamente con Histamina, Carbacol y KCl.

Los resultados con respecto al comportamiento del músculo liso al inducir en él, la contracción con los tres diferentes agonistas, fue de diferente magnitud, de tal forma que la inducida por Carbacol fue mayor que la inducida por Histamina y a su vez ésta fue mayor que la inducida por alto Potasio.

Este hallazgo nos puede dar una idea de que en la célula del músculo liso traqueal probablemente existe mayor

densidad de canales de Calcio sensibles a receptor por unidad de área ya que la mayor contracción que se obtuvo en las preparaciones in vitro fue cuando se utilizó el Carbacol como agonista el cual abre canales de Calcio sensibles a receptor al igual que la Histamina, sólo que esta última parece abrir menor número de canales sensibles a receptor en comparación con el Carbacol.

Lo anteriormente señalado puede ser posible ya que la magnitud de las contracciones inducidas por Carbacol, Histamina y KCl en el músculo liso bronquial fueron diferentes aún cuando las concentraciones para obtener la máxima respuesta contráctil para Histamina y Carbacol fue la misma ( $5E-5$  M).

Estos resultados nos muestran la existencia de los dos diferentes canales de Calcio (Meisheri KD, 1981, Cauvin C. Lukeman, 1984, Cauvin C. Saida K, 1984), uno de los cuales es sensible a Potencial y que fue activado por la solución de KCl, y otro sensible a Receptor, que fue activado por Histamina y por Carbacol en forma separada, ya que estos agonistas se utilizaron en forma individual tanto en dosis únicas como en dosis acumulativas en las preparaciones in vitro.

Por otro lado los resultados obtenidos en cuanto al efecto de Calcio antagonistas como el Verapamil, Bepridil y Diltiazem administrados previamente a la inducción de la contracción con KCl, Histamina o Carbacol, revelan la posibilidad de que dichas drogas Calcio antagonistas puedan ser utilizadas en la profilaxia de el broncoespasmo producido durante estados asmáticos. Ya que como se puede observar en las figuras 3, 6 Y 9 el Verapamil logró prevenir por lo menos en un 40 % la contracción inducida con Histamina y Carbacol (figuras 6 y 9

respectivamente), mientras que para la inducida con KCl logro prevenirla en un 60 % (figura 3), lo que también nos revela que la sensibilidad a los Calcio antagonistas es mayor en los canales de Calcio sensibles a Potencial que en los canales de Calcio sensibles a Receptor.

Mientras que el Diltiazem logró prevenir un 25 % de la contracción inducida por Histamina y Carbacol figuras 5 y 8 respectivamente el caso de la inducida con KCl logro prevenirla en un 50 % (figura 2). Observándose nuevamente que los canales de Calcio sensibles a Potencial son bloqueados más rápidamente que los sensibles a Receptor.

Los datos obtenidos en cuanto al efecto del Bepridil, muestran que éste logró inhibir aproximadamente el 40 % de la contracción inducida con KCl e Histamina (figuras 1 y 4 respectivamente), en cambio para la inducida con Carbacol sólo logró inhibirla en un 25 % como se puede observar en la figura 7.

Hasta este punto de la investigación lo que se ha podido determinar es que una dosis de  $1E-6$  M de Calcio antagonistas como el Verapamil Bepridil y Diltiazem, pueden emplearse en la profilaxis del broncoespasmo según la siguiente tabla:

T A B L A V I

	VERAPAMIL	DILTIAZEM	BEPRIDIL
% D E I N H I B I C I O N			
AGONISTA			
KCl	60	50	40
Histamina	40	25	40
Carbacol	40	25	25

De acuerdo con los datos anteriores el Verapamil a una concentración de  $1E-6$  M es el Calcio antagonista que funciona mejor en la profilaxia de la broncoconstricción, para inhibir la respuesta celular producida por los tres diferentes agonista empleados.

El Diltiazem a una concentración de  $1E-6$  M funciona mejor para inhibir la contracción inducida con KCl ya que la inducida con Histamina y Carbacol sólo logra prevenirla en un 25 % poco menos de lo que logra el Verapamil.

Mientras que, el Bepridil a una concentración igual que los Calcio antagonistas anteriores ( $1E-6$  M) logra inhibir la contracción inducida con KCl e Histamina, aunque no también como lo hace el Verapamil y el Diltiazem al inhibir el flujo de Calcio provocado por el estímulo con KCl a una concentración de  $1E-2$  M.

Los datos anteriormente señalados concuerdan con estudios, sobre los Calcio bloqueadores (M. D. Cristobal H. Fanta, 1985) los cuales fueron efectuados en pacientes asmáticos para la prevención de la broncoconstricción inducida por el ejercicio, demostrándose que la broncoconstricción es inhibida significativamente por la premedicación con Verapamil inhalado a una dosis de 3 mgs. y Nifedipina sublingual a una dosis de 10 mgs.

También se encontró que el Diltiazem en una dosis de  $1E-4$  M es capaz de inhibir el 50 % de la contracción inducida por Histamina, esto en experimentos in vitro sobre tiras traqueales aisladas de cobayos. (Nagao T. Iwasawa Y. Ikezawak, 1981. Douglas J. S, Binkc. 1977).

Como se puede observar en la tabla IV, el Bepridil logró inhibir la respuesta contráctil de la Histamina y del KCl mas no la inducida por Carbacol, por lo que podemos decir que no todos los canales de Calcio son iguales sino que existen entre ellos diferencias de afinidad, composición molecular, y muy posiblemente mecanismos bioquímicos, que determinan la capacidad de las drogas para bloquear el flujo de Calcio al interior de la célula y de esta forma inhibir la contracción, ya que sin esta ión es imposible que el proceso de contracción se lleve a cabo.

El efecto que los diferentes Calcio antagonistas producen después de haberse inducido la contracción con los agonistas también fue investigado y los resultados al respecto indican que el Verapamil es uno de los Calcio Bloqueadores más potentes ya que éste es capaz de revertir en un 100 % la contracción inducida por cualquiera de los tres agonistas, como se puede observar en las figuras 16, 17 y 18.

El Diltiazem sólo logró inhibir completamente la contracción inducida con KCl mientras que la inducida con los otros dos agonistas (Histamina y Carbacol), inhibió sólo el 75 % del efecto producido por los agonistas, lo cual nos dice que el Diltiazem es una droga que tiene un efecto mayor sobre los canales de Calcio dependientes de potencial que sobre los dependientes de receptor (figuras 22, 23 y 24).

Los resultados con respecto al efecto del Bepridil indican que los canales de Calcio sensibles a Potencial son mucho más susceptibles al bloqueo por esta droga que los canales de Calcio sensibles a receptor (19, 20 y 21).

C O N C L U S I O N E S

## CONCLUSIONES

La aplicación rutinaria hasta la fecha de los Calcio antagonistas se a hecho para tratar problemas cardiovasculares en los humanos.

En la siguiente tabla se presentan una serie de datos, sacados de la literatura en la que se señalan las concentraciones molares de cada uno de los diferentes antagonistas en las patologías señaladas en el encabezado de la tabla VII. Esto con el fin de compararlos con los datos experimentales obtenidos en este trabajo (tabla VI).

T A B L A      V I I

DATOS DE LA LITERATURA:	ANGINA	PROBLEMAS RESPIRATORIOS		
Diltiazem	1.24E-7 M *	1.463E-4 M <		
Verapamil	6.37E-8 M ^	1.568E-5 M >		
Bepridil	-----	-----		
Nifedipina	6.23E-7 M @	6.23E-7 M &		
" DATOS EXPERIMENTALES "				
	Pretratamiento	Post-tratamiento. Contracción inducida con:		
		KCl	Histamina	Carbacol
Diltiazem	5E-6 M	5E-6 M	5E-6 M	2E-5 M
Verapamil	5E-6 M	2E-6 M	1E-5 M	3E-5 M
Bepridil	5E-6 M	8E-6 M	1.5E-5 M	2.5E-5 M

\* Herman et al, @ Foster et al, & DRUGS 3.

^ Freedman et al, > Robert E. Kates, < Van Breemen C.

Los datos más abundantes fueron los encontrados para Diltiazem, Verapamil y Nifedipina utilizados como antianginosos y antiarritimicos.

En cambio para problemas respiratorios el uso de esas drogas no es frecuente y los datos son escuetos, señalándose estos en la segunda columna de la tabla VII. En la que se muestra que las concentraciones utilizadas de Verapamil y Diltiazem son altas en comparación a cuando estas drogas son utilizadas como antianginosos.

Lo anterior nos da idea de que el Verapamil y el Diltiazem no pueden ser empleados de manera segura en problemas respiratorios ya que a tales concentraciones terapéuticas producen efectos deletereos sobre el sistema cardiovascular. Aunque esto no es del todo concluyente, ya que los datos señalados para problemas respiratorios son escasos y además se sabe que un ataque asmático puede ser inducido por diferentes causas entre ellas por alergenicos, por el ejercicio y por la inhalación de aire frío. De manera que los datos que se señalan en la tabla VII para problemas respiratorios sólo son válidos para asma inducida por ejercicio, pero no hay datos disponibles aún, para casos de Asma inducida por los otros dos factores mencionados.

En el caso de la Nifedipina, como se puede observar en la tabla anterior, es la única droga que se emplea en concentraciones equimolares cuando es utilizada en problemas cardiovasculares y respiratorios.

En la parte inferior de la tabla VII se muestran

las concentraciones empleadas en este trabajo son menos elevadas que las concentraciones a las que el Diltiazem es empleado en problemas respiratorios. Esta situación deja aun abierta la investigación a la posibilidad de que los Calcio antagonistas sean útiles en otros casos de broncoespasmo además del inducido por el ejercicio, como cuando el Broncoespasmo es inducido por frío, polvos, polen, y algunas respuestas anafilácticas.

**B I B L I O G R A F I A**

## B I B L I O G R A F I A

---

- 1.- Adelstein, R. S. & triggle, D. J.  
Purification and characterisation of smooth muscle myosin  
light chain kinase.  
J. Biol. Chem., 1981, 256: 7501-7509.
- 2.- Akcasu, A.  
Action of drugs on the isolated trachea.  
J. Pharmacol. 1952, 4:671.
- 3.- Altounyan REC.  
Inhibition of experimental asthma by a new compound disodium  
cromoglycate.  
Acta Allergy 1967, 22:487.
- 4.- Biggs. D. F.  
Direct and indirect of transmitters and other substances on  
smooth muscle.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 1984, 62:727-733.
- 5.- Bolton, T. B.  
Mechanisms of action of transmitters and other substances on  
smooth muscle.  
Physiol. Rev. 1979, 59: 606-718.
- 6.- Bramah N. Singh, M D. DPhil, Sherrin Baky, M S, and Koonlawee  
Nademanee, M D.  
Second-Generation Calcium Antagonists: Search for Greater  
Selectivity and Versatility.  
Am. J. Cardiol. 1985, Vol. 55.
- 7.- Carafoli E, Clementi F, Darbikowzki W, et al.  
Calcium transport in contraction and secretion.  
Amsterdam; North, Holland Publishing 1978.
- 8.- Castillo J. C. and De Beer, E. J.  
The tracheal chain preparation for the study of  
antispasmodics with particular reference to bronchodilator  
drugs.  
J. Pharmacol Exp. ther. 1947, 90:104-199.
- 9.- Cauvin C. Loutzenhizer, R & Van Breemen C.  
Mechanisms of calcium antagonist induced vasodilation.  
Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1983, 23: 373-396.
- 10.- Cauvin C. Lukeman S. Cameron J. et al.  
Theoretical bases for vascular selectivity of calcium  
antagonists.  
J. Cardiovasc. Pharmacol 1984, 6 (suppl. 4): S630-8.

- 11.- Cauvin, C., Saida, K & Van Breemen, C.  
Effects of Ca-antagonists on Ca fluxes in resistance vesseles.  
J. Cardiovasc. Pharmacol 1982, 4 (suppl. 3): 287-290.
- 12.- Christopher H. Fanta Md.  
Calcium channel blockers in profilaxis and treatment of  
asthma.  
Am J. Cardiol 1985, 55: 202B-209B.
- 13.- Coburn, R. F. & Yamaguchi, T.  
Membrane potential-dependent and-independent tension in the  
canine tracheal muscle.  
J. Pharmac. Exp. ther., 1977, 201: 276-284.
- 14.- Coburn, R. F.  
Electromechanical coupling in canine trachealis muscle:  
acetylcholine contractions.  
Am. J. Physiol., 1979, 236: C177-C184.
- 15.- Constantine J W.  
The spirally cut tracheal strip preparation.  
J. Pharmacol 1965, 17: 384-385.
- 16.- C. S. Venugopalan.  
Comparison of response of tracheal twin spirals to  
bronchoactive agents.  
Clin. Pharmacol 1985, 7(10): 519-521.
- 17.- Cynthia Cauvin and Cornelis van Breemen.  
Diferent Ca<sup>2+</sup> channels along the arterial tree.  
J. Cardiovasc. Pharmacol 1985, 7 (suppl. 4).
- 18.- Daniel, E. E., Grover, A. K. & Kwan, C. Y.  
Calcium Biochemistry of smooth muscle.  
Vol. III (1-88) ed. Sthephens, N. L., 1983, Boca Raton,  
Florida: CRC Press Inc.
- 19.- David G. Tinkelman, M. D.  
Calcium channel blocking agents in the Prophylaxis of  
Asthma.  
The American Journal of Medicine, 1985 February vol. 78  
(suppl 213).
- 20.- Dixon, J. S. & Small, R. C.  
Evidence of poor conduction of muscle excitation in the  
longitudinal axis of guinea-pig isolated tracheal.  
Br. J. Pharmac., 1983, 79: 75-83.
- 22.- Douglas J S, Ridgway P, Brink C.  
Airway responses of the guinea pig in vivo and in vitro.  
J. Pharmacol Exp. Ther 1977, 202: 116-124.
- 23.- Dabrowska, R., Aromatoria, D., Sherry, J.M.F. & Hartshorne.  
Composition of the myosin lighth chain kinase from chicken

gizzard.

Biochim. Biophys. Res. Comm., 1977, 78: 1263-1272.

- 24.- Drugs.  
1985, Vol. 30, pág. 192.
- 25.- E. Chandler Deal., M.D., Andrew D Cherniack.  
Effects of Verapamil on Histamine and Carbacol-Induced contraction of Pulmonary tissues in vitro.  
Chest/86/5/November 1984.
- 26.- Edward D. Hogestatt.  
Characterization of two different Calcium entry pathways in small mesenteric arteries from rat.  
Acta Physiol. Scand 1984, 122: 483-495.
- 27.- Farley, J. M. & Miles, P. R.  
Role of depolarisation in acetylcholine-induced contractions of dog trachealis muscle.  
J. Pharmac. exp. ther., 1977, 201: 199-205.
- 28.- Fanta CH. Venugopalan CS, Lacouture PG, Drazen JM.  
Inhibition of bronchoconstrictor.  
Am Rev. Respir. Dis., 1978, pág:275-679.
- 29.- Fleckenstein A.  
History of calcium antagonists.  
Cir. Res. 1983, 52 (suppl. 1): 1-3-1-16.
- 30.- Fleckenstein A.  
Specific Pharmacology of calcium antagonists in myocardium, pacemakers and vascular smooth muscle.  
Amu. Rev. Pharmacol Toxicol 1979, 17: 149-166.
- 31.- Fleckenstein Grun G, Fleckenstein A, Byon YK. Kim KW.  
Mechanism of action of Calcium antagonists in the treatment of coronary disease with special referenc to perbexiline maleate.  
Amsterdam: Excerpta Medica 1978, pág: 1-22
- 32.- Foster et al.  
Drugs.  
1983, Vol. 30: 218.
- 33.- Foster, R. W., OK palugu, B. I & Small, R. C.  
Antagonism of Ca<sup>++</sup> and other actions of Verapamil in guinea pig isolated trachealis.  
Br. J. Pharmac., 1984, 81: 499-507.
- 34.- Foster, R. W., Small, R. C. Weston, A. H.  
Thespasmogenic action of potassium choride in guinea-pig trachealis.  
Br. J. Pharmac., 1983, 80: 553-559.

- 35.- Freedman et al.  
Verapamil kinetics in normal subjects and patients with coronary artery spasm.  
Clin Pharmac Ther November 1981, 30:646.
- 36.- Herman et al.  
Drugs.  
1985, Vol. 29: 192.
- 37.- I. W. Rodger.  
Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway.  
J. Clin Pharmac. 1985, 20: 255S-266S.
- 38.- Janice B. Schwartz. D. R. Abernethy. A. Taylor & J. R. Mitchell.  
An investigation of the cause of accumulation of Verapamil during regular dosing in patients.  
J. Clin Pharmac 1985, Vol. 19.
- 39.- Kirk Patrick, C. T.  
Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle.  
J. Physiol., 1975, 244: 263-281.
- 40.- Loutzenhiser R. & Van Breemen C.  
The influence of receptor occupation on Ca<sup>++</sup> influx mediated vascular smooth contraction.  
Circular Res, 1983, 52(Suppl. 1): 97-103.
- 41.- McCaig, D. J. & Souhrada, J. F.  
Alteration of electrophysiological properties of airway smooth muscle from sensitised guinea pigs.  
Resp. Physiol., 1980, 41: 49-60.
- 42.- Meisheri, K., Hwang, O. Van Breemen, C.  
Evidence for two separate Ca<sup>++</sup> pathways in smooth muscle plasmalemma.  
J. memb. Biol., 1981, 59: 19-25.
- 43.- Mongar JL, Schild HO.  
The effect of Calcium and pH on the anaphylactic Histamine release.  
J. Physiol (Lond) 1958, 140: 272-282.
- 44.- Nagao T, Iwasawa Y, Ikezawa K, Murata S, Sato M.  
Bronchodilator actions of Diltiazem in vitro and in vivo.  
Folia Pharmacol Jpn. 1981, 77: 553-558.
- 45.- O. Doherty, J., Youmans, S. J.  
Calcium regulation during stimulus secretion coupling: continuous measurement of intracellular calcium activities.  
Science, 1980, 209: 510-573.
- 46.- Orr TSC.  
Mast cells and allergic Asthma.  
Br J Dis Chest 1973, 67: 87-106.

- 47.- Patel KR.  
The effect of Verapamil on Histamine and Methacholine induced bronchoconstriction.  
Clin All 1981, 11: 441-447.
- 48.- Patel KR.  
Calcium antagonists in exercise-induced Asthma.  
Br. Med J 1981, 282: 932-933.
- 49.- Robert E. Kates, Ph. D., Deborah L. D.  
Verapamil disposition kinetics in chronic atrial fibrillation.  
Clin Pharmacol Ther, July 1981, 30: 44.
- 50.- Saida K Van Breemen C.  
Mechanism of Ca<sup>2+</sup> antagonists induced Vasodilation: intracellular actions.  
Circ. Res. 1983, 52: 137-142.
- 51.- Schwartz J. B. Keefe D. L. Kirsten E., Kates R. E., & Harrison D. C.  
Prolongation of Verapamil elimination kinetics during chronic oral administration.  
Am Heart J., 1982, 104.
- 52.- Small, R. C.  
Electrical slow waves and tone of guinea pig isolates trachealis muscle: the effects of drugs and temperature changes.  
Br. J. Pharmac., 1982, 77: 45-54.
- 53.- Ticku, M. K. & Triggle, D J.  
Calcium and the muscarinic receptor.  
Gen. Pharmac., 1976, 7: 133-240.
- 54.- Timothy J. Kamp, Richard J. Miller.  
Voltage-sensitive Calcium channels and Calcium antagonists.  
Pharmacology 1987, vol. 1.
- 55.- Van Breemen C. Hwang O. Meishen KD.  
The mechanism of inhibitory action of Diltiazem on vascular smooth muscle contractility.  
J Pharmacol Exp. Ther 1981, 218: 459-464.
- 56.- Van Breemen, C. Aarson, P. & Loutzenhisder, R.  
Sodium-Calcium interactions in mammalian smooth muscle.  
Pharmacol Rev. 1979, 30: 167-208.
- 57.- Weiss GB.  
Calcium in drug action.  
New York; Plenum Publishing, 1978, 3-32.

